

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO IN BIOLOGIA AVANZATA
XXII CICLO**

**Relazioni genetiche, basate sull'analisi del
polimorfismo ISSR, tra la *Nicotiana wuttkei*
Clarkson & Symon ed altre specie del genere
Nicotiana appartenenti alla sezione *Suaveolentes***

Dott.ssa Loredana Barbato

TUTOR
Ch.ma Prof.ssa
Simonetta Giordano

COORDINATORE
Ch.mo Prof.re
Luciano Gaudio

Co-tutor
Dott.ssa Luisa del Piano

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Indice

1 Introduzione

1.1 Caratteri botanici del genere <i>Nicotiana</i>	pag. 5
1.2 Cenni storici della classificazione del genere <i>Nicotiana</i>	pag.17
1.3 Descrizione delle sezioni del genere <i>Nicotiana</i> (Knapp, 2004)	pag. 29
1.4 Biogeografia delle sezioni del genere <i>Nicotiana</i>	pag. 32
1.5 Sezione <i>Suaveolentes</i>	pag. 34
1.5.1 Distribuzione e relazione intraspecifica tra della sezione <i>Suaveolentes</i>	pag. 38
1.6 <i>Nicotiana wuttkei</i>	pag. 48
1.7 Marcatori molecolari	pag. 50
Progetto	pag. 56

2 Materiali e Metodi

2.1 Allevamento delle piante	pag. 57
2.2 Analisi citologica dell'apice radicale	pag. 59
2.3 Isolamento di DNA genomico	pag. 61
2.4 Determinazione della concentrazione di DNA	pag. 62
2.5 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio	pag. 63
2.6 Reazione di amplificazione ISSR	pag. 64
2.7 Analisi dei dati molecolari	pag. 66

3 Risultati e Discussione

3.1 Osservazioni morfologiche sulla <i>N. wuttkei</i>	pag. 67
3.2 Determinazione del numero dei cromosomi	pag. 72
3.3 Analisi della variabilità genetica delle specie esaminate mediante marcatori molecolari ISSR	pag. 76

Conclusioni

pag. 93

Bibliografia

pag. 98

Introduzione

I progressi nella ricerca botanica spesso sono dipesi dalla opportuna scelta dell'organismo vegetale da utilizzare come modello sperimentale. A questo riguardo, è ben noto che le specie del genere *Nicotiana* sono state ampiamente utilizzate in numerose ricerche nel campo della biologia, della genetica, della biochimica, della fisiologia e negli ultimi decenni in quello molecolare. In particolare la *Nicotiana tabacum* ha assunto un ruolo di organismo modello, poiché si presta alla trasformazione e all'espressione di geni esogeni ed inoltre risulta una specie particolarmente "plastica" per le colture in vitro. Il genere *Nicotiana* costituisce un sistema modello ideale per indagini sull'evoluzione genomica grazie alle numerose variazioni e ai differenti stadi evolutivi riconoscibili nelle numerose specie che lo compongono. In particolare tale genere è stato utilizzato per lo studio dell'evoluzione associata alla poliploidia, fattore chiave nell'evoluzione delle piante e per la formazione di nuove specie. Infatti, la poliploidizzazione mediante raddoppiamento genomico è un evento abbastanza ubiquitario nelle piante (Wendel, 2000). Questo evento è uno dei fattori che amplia la diversità genetica, mediante mutazioni e riarrangiamenti genomici successivi ed è quindi importante nel meccanismo di speciazione (Soltis, 2004). Numerosi studi hanno rivelato che la poliploidia è associata alla conversione genica, all'amplificazione, alla perdita di sequenze e ad eventi di traslocazione e mutazione dei cromosomi (Leitch and Bennett, 1997; Levy and Feldman, 2002; Soltis et al., 2004; Wendel, 2000). Le specie di *Nicotiana* comprendono due categorie in relazione alle loro caratteristiche citogenetiche: una costituita da specie con numero cromosomico $2n=24$ e i loro discendenti con $2n=18\sim20$, ed un'altra costituita da specie con $2n=48$ e i loro discendenti con $2n=32\sim46$ (Goodspeed, 1954). E' verosimile che le specie appartenenti alla prima categoria siano diploidi, mentre le specie della seconda categoria siano derivate da anfidiplodizzazione delle specie con $2n=24$. Le discendenze genetiche del gruppo $2n=48$ non sono molto chiare; la speciazione sembra essere più complessa e dovuta a eventi ricorrenti

di ibridizzazione o di introgressione tra le specie ancestrali, così come a possibili processi di fusione cromosomica (Goodspeed, 1954). Le specie anfidiploidi ed i loro discendenti possiedono caratteri utili e desiderabili quali la resistenza a patogeni vegetali ed insetti fitofagi. La conoscenza della composizione del genoma e le relazioni genomiche sono importanti per comprendere i processi evolutivi delle specie di *Nicotiana* e per un più efficace utilizzo dei loro caratteri in programmi di miglioramento genetico.

1.1 Caratteri botanici del genere *Nicotiana*

Il genere *Nicotiana* appartiene alle Angiosperme Eudicotiledoni, ordine delle Solanales, famiglia delle Solanaceae. Esso è costituito da piante annuali a fusto erbaceo o pluriennali a fusto semilegnoso. La superficie del fusto, fatta qualche eccezione (*Nicotiana glauca* Graham e *Nicotiana thyrsiflora* Goodspeed), si presenta vischiosa, essendo cosparsa di peli glanduliferi. In alcune specie il fusto è alto appena 30 cm, mentre in altre raggiunge persino i 3-4 metri. La radice è fittonata con ramificazione più o meno abbondante; alla base del fusto si formano delle radici avventizie le quali danno all'apparato radicale un aspetto fascicolato. Le foglie sono semplici, sessili o picciolate con lunghezza da pochi centimetri a circa un metro; la forma varia da ovata a cordata, lineare o lanceolata, con lembo a margine intero alcune volte ondulato, sinuoso o dentellato (Figura 1). Spesso sono osservati dei cambiamenti nella forma delle foglie o di presenza e lunghezza del picciolo passando dalle foglie basali a quelle apicali. Anche le foglie presentano una superficie vischiosa per la presenza di peli ghiandolari (tricomi). I tricomi possono essere di diverso tipo a seconda della specie e dell'organo: semplici, ramificati, con testa ghiandolare, con testa ellissoidale, con cellule di stelo specializzate e gli idatodi (Figura 2).

I fiori sono disposti in infiorescenze complesse di tipo a pannocchia o a racemo (Figura 3). Il calice è pentagamosepalo è ricoperto di peli ghiandolari, meno numerosi nella superficie interna. La corolla è pentagamopetala, attinomorfa con tubo diritto o un po' curvo e lembo quinquelobo o pentagonale, di colore vario: rosa, rosso, giallo-verdastro, bianco, violaceo (Figura 4). La forma del tubo corollino può caratterizzare le sezioni e/o le specie del genere *Nicotiana*; esso può presentare asse diritto o ricurvo, simmetrico o asimmetrico. Si possono distinguere 6 tipi principali (Figura 5):

Tipo I- Tubo propriamente detto corto e distinto; gola diverse volte più lunga del tubo; gola da obconica a clavata nella forma.

Tipo II- Asse ricurvo, estremo sviluppo dell'espansione della gola a livello apicale, tendenza alla scomparsa del tubo.

Tipo III- Asimmetrico.

Tipo IV- Gola simmetrica, lunghezza gola superiore a 2 volte lunghezza tubo propriamente detto; gola senza dilatazioni o rigonfiamenti apicali.

Tipo V-Tubo propriamente detto circa $\frac{1}{3}$ della gola; la gola presenta una espansione unilaterale; la gola non presenta espansione apicale.

Tipo VI- Parte tubulare cilindrica; gola molto corta rispetto al tubo ma chiaramente distinta.

La superficie esterna del tubo corollino e dei lobi corollini è rivestita di peli ghiandolari, mentre la superficie interna è glabra sino al punto in cui si ha l'adesione dei filamenti staminali. L'androceo è pentandro, costituito di 5 stami, alterni con i petali.

Le antere sono costituite ciascuna da due teche; la deiscenza in ciascuna teca avviene mediante fenditura longitudinale laterale. I filamenti sono saldati al tubo corollino e si attaccano alle antere nel punto in cui incomincia la spartizione basale delle teche (Figura 6). Il polline è polverulento, a granelli ellittici ed ovali, con tre pori di deiscenza. Il gineceo è costituito di un pistillo bicarpellare, sincarpo, disposto obliquamente rispetto al piano mediano del fiore, per cui non è possibile condurre nel fiore stesso più di un piano di simmetria, caratteristica questa comune a tutte le Solanaceae. L'ovario è supero, biloculare, qualche volta quadriloculare o pluriloculare, circondato alla base da un anello (cercine) nettarifero, di colore verde giallastro o rossastro (Figura 6). La placentazione è di tipo centrale e gli ovuli sono numerosi. Lo stilo è semplice ed eretto, lo stigma capitato, bilobo (Figura 7). Il frutto è una capsula setticida, ovata-conica o sub-globosa od oblunga, con il calice concresciuto (Figura 8). I semi hanno lunghezza da 0,4 ad 1,3 mm e sono di forma ovale, ellittica, sferica o reniforme. Il tegumento del seme si presenta opaco o lucido di colore dal marrone chiaro al nero con superficie rugoso-reticolata od alveolata. L'aspetto della reticolazione varia con le dimensioni delle cellule dell'epidermide e con il grado di avvallamento delle pareti esterne e dal

rado di ondulazione delle creste. L'embrione è immerso in abbondante endosperma bianco. In circa metà delle specie l'embrione è diritto o leggermente incurvato, nelle rimanenti specie ripiegato o curvo. I cotiledoni costituiscono generalmente un terzo o un quarto dell'intero embrione e possono avere dimensioni uguali o leggermente diverse (Figura 9). Quasi tutte le piante del genere *Nicotiana* contengono in maggiore o minore quantità l'alcaloide nicotina in ogni loro parte, fuorché nei semi (Lattanzi, 1957).

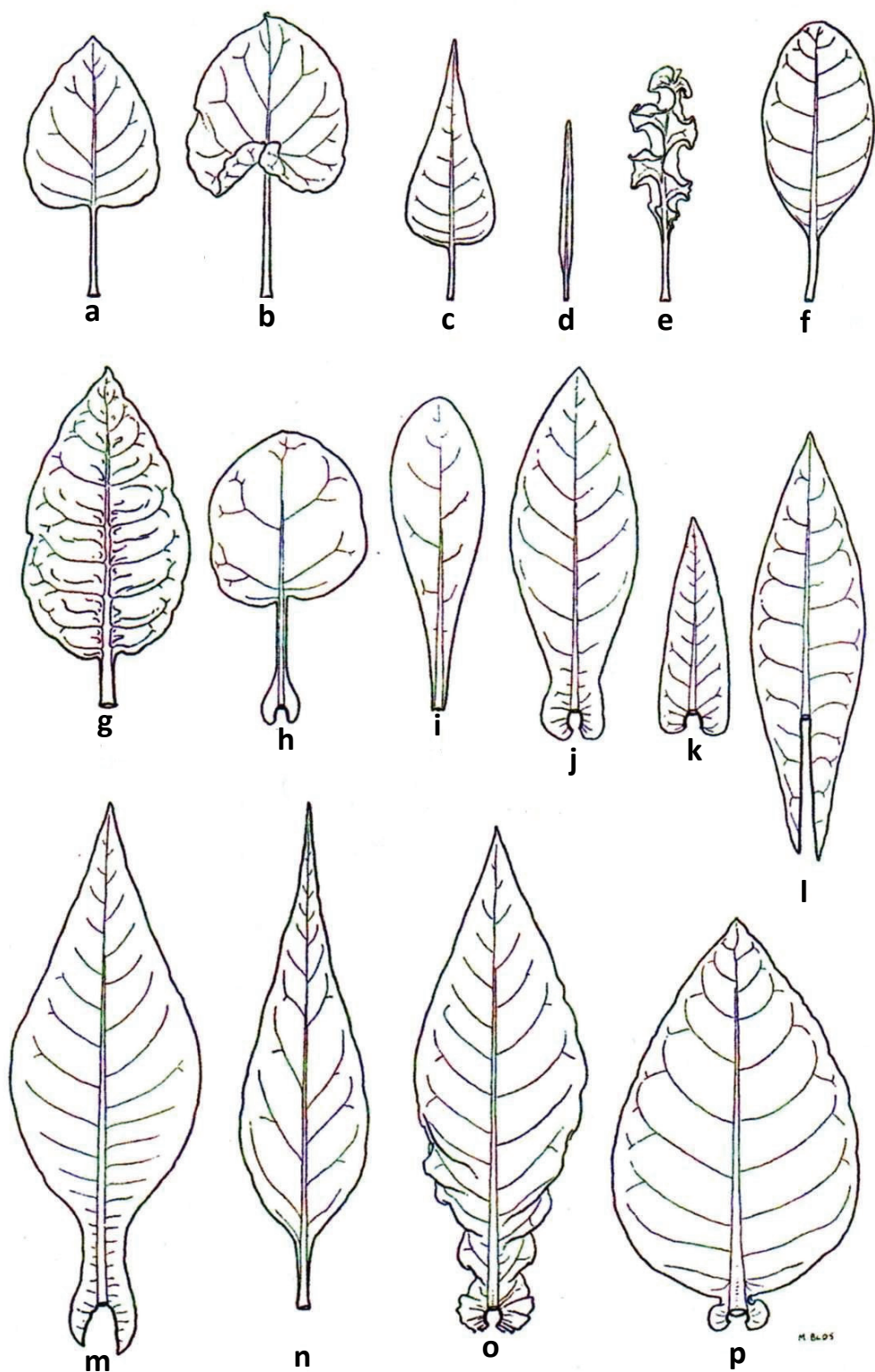


Figura 1. Tipi di foglia. a, *N. paniculata* ; b, *N. glutinosa*; c, *N. acuminata*; d, *N. noctiflora*; e, *N. ameghinoi*; f, g, *N. undulata* (f, rosetta; g, caulina); h, *N. stocktonii*; i- k, *N. trigonopylla* (i, rosetta; j, caulina inferiore; k, caulina superiore); l, *N. excelsior*; m, *N. tomentosa*; n-p, *N. tabacum* (n, "angustifolia"; o, "Connecticut Broadleaf"; p, "purpurea". Ingrandimento (x): a-m X: 1/6; n-p, X: 1/10. Da Goodspeed, 1954.

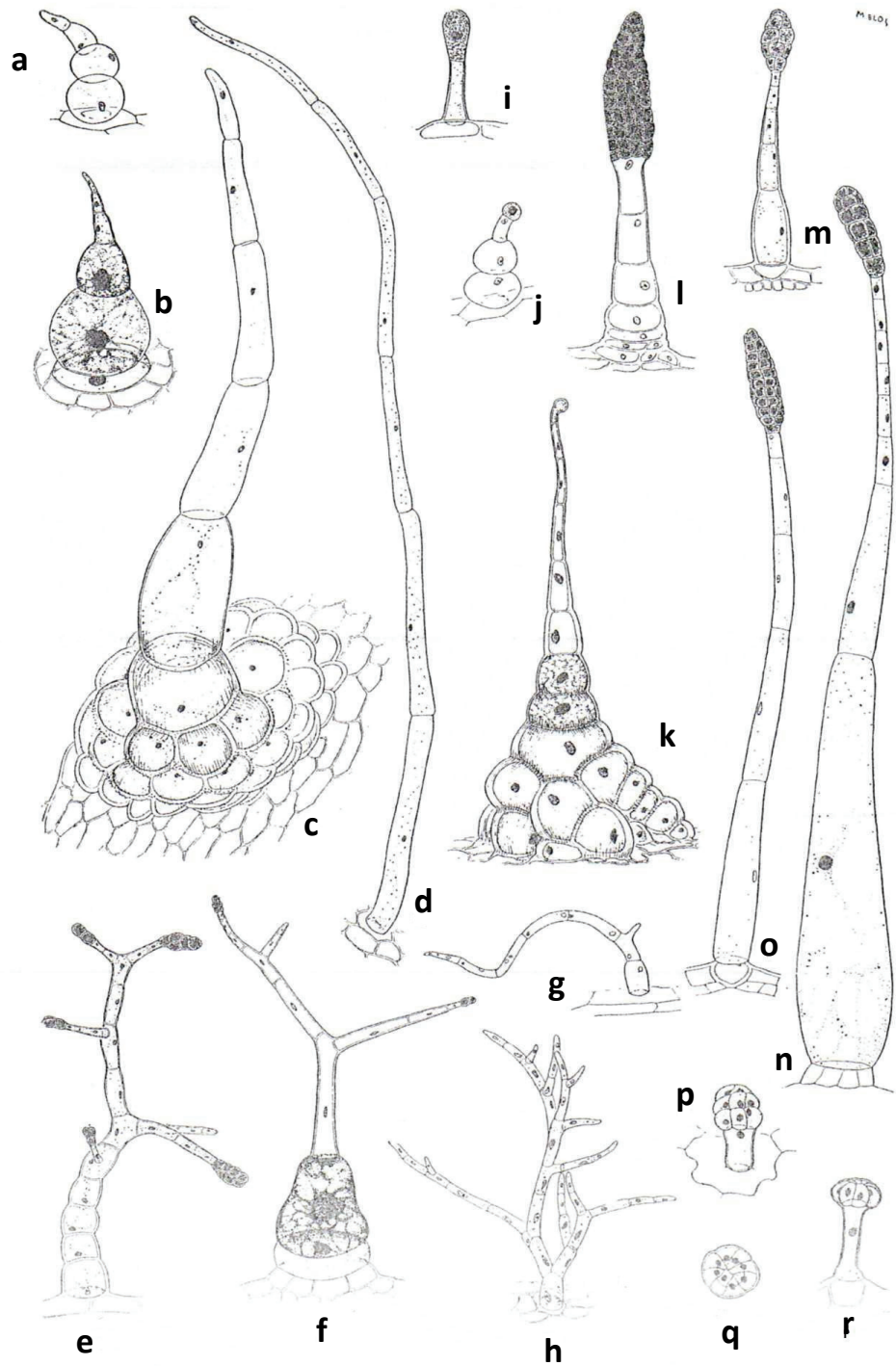


Figura 2. Tipi di tricoma. (A, semplice; B, ramificato; C, testa glandulare; D, con cellule di stelo specializzate; E, idatode. Tipo A, a-d: a, *N. raimondii* (picciolo); b, *N. benavidesii* (calice); c, *N. longiflora* (picciolo); d, *N. maritima* (picciolo). Tipo B, e-h: e, *N. setchellii* (fusto); f, *N. trigonophylla* (calice); g, *N. paniculata* (picciolo); h, *N. tomentosa* (picciolo). Tipo C, e, f, i-o: e, *N. setchellii* (fusto); f, *N. trigonophylla* (calice); i, *N. stocktonii* (calice); j, *N. raimondii* (picciolo); k, *N. megalosiphon* (calice); l, *N. acuminata* (pedicello); m, *N. sylvestris* (fusto); n, *N. tabacum* ("purpurea") (fusto); o, b, *N. otophora* (pedicello). Tipo D, b, f, k: *N. benavidesii* (calice); f, *N. trigonophylla* (calice); k, *N. megalosiphon* (calice); Tipo E, p-r: p, *N. paniculata* (lamina foglia superiore); q, r, *N. goodspeedii* (calice). Ingrandimento: 80X eccetto i, p-r, 150X. Da Goodspeed, 1954.

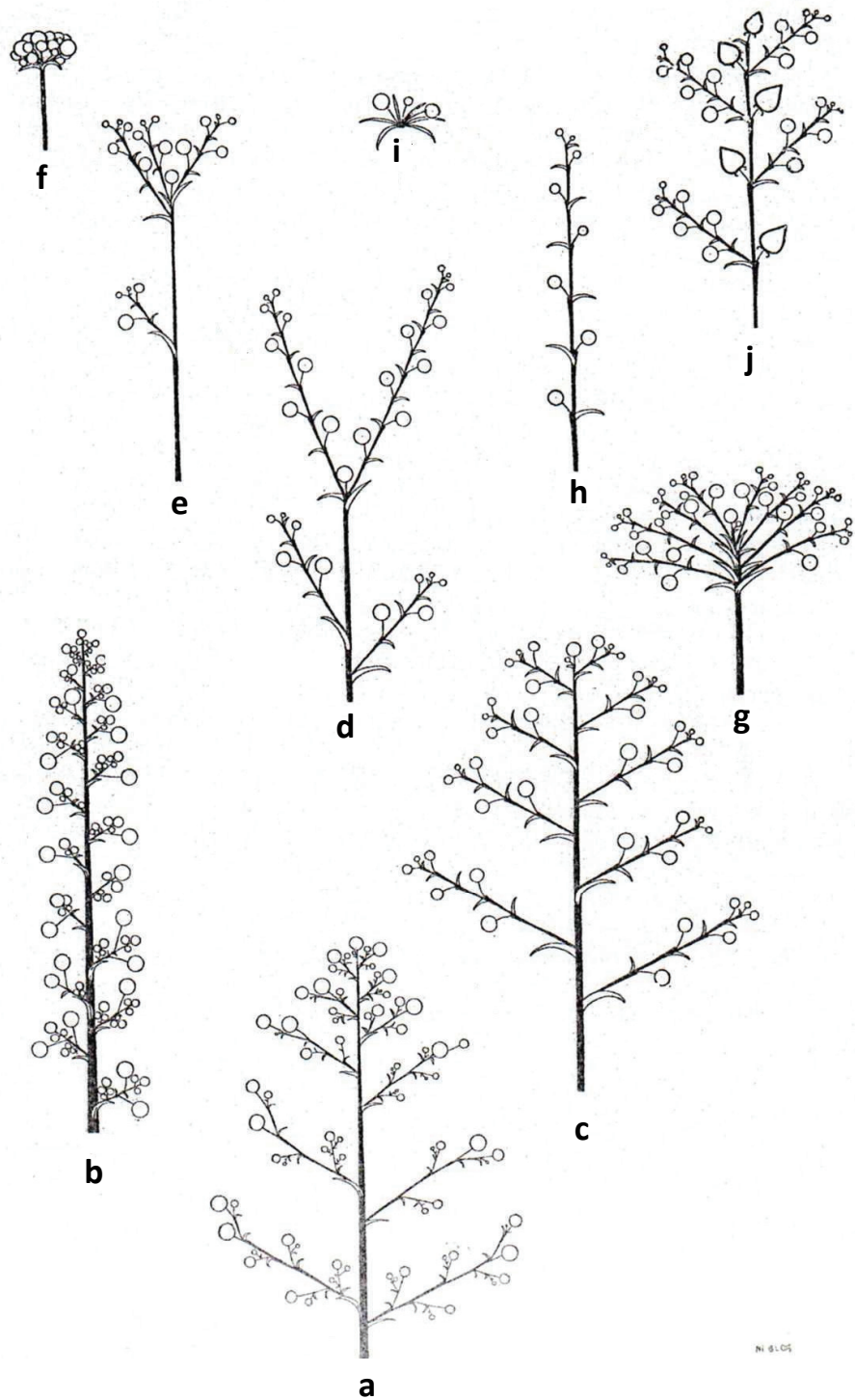


Figura 3. Tipi di infiorescenza. a, pannocchia (*N. paniculata*); b, pannocchia a colonna (*N. benavidesii*); c, pannocchia senza ramificazioni secondarie (*N. tomentosiformis*); d,e falso racemo (*N. repanda*; *N. stocktonii*); f, corimbosa (*N. corymbosa*); g, pannocchia senza ramificazioni secondarie (*N. tomentosa*); h, racemo (*N. longiflora*); i, grappolo acaule (*N. acaulis*); j, falso racemo (*N. acuminata*). Da Goodspeed, 1954.

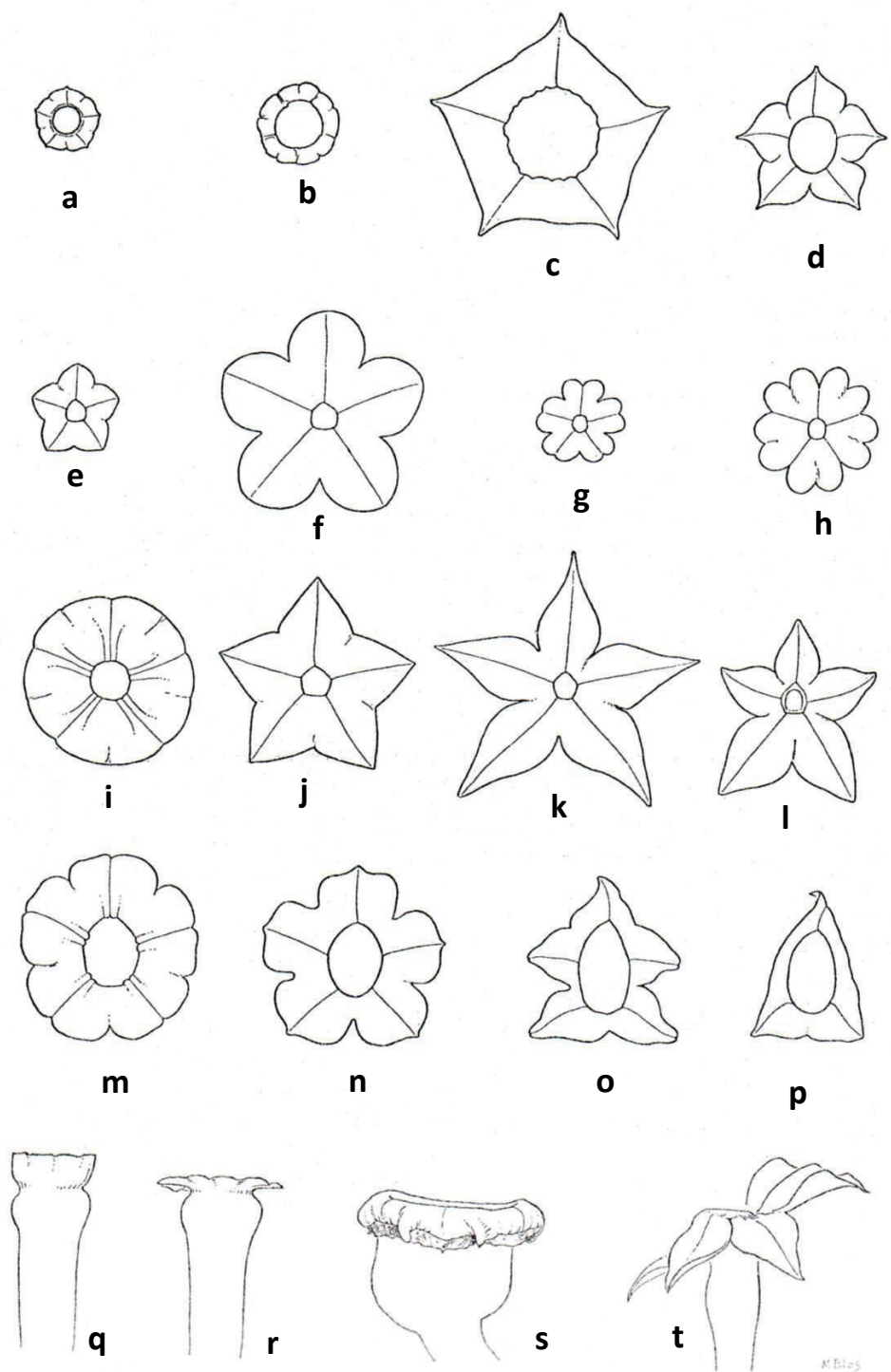


Figura 4. Forma e orientamento del lembo della corolla. Forma: a-p. Subintero circolare: a, *N. knightiana*; b, *N. cordifolia*; i, *N. pauciflora*. Subintero pentagonale: c, *N. setchellii*. Ottuso-lobato: e, *N. attenuata*; f, *N. gossei*. Cordato-lobato: g, *N. maritima*; h, *N. occidentalis*. Acuto-lobato: d, *N. tomentosa*; j, *N. sylvestris*. Ovato acuto-lobato: k, *N. longiflora*; l, *N. bonariensis*. Variazioni di forma in *N. glutinosa*: m-p. Orientamento: q-t. Eretto, q, *N. glauca*. Orizzontale r *N. glauca*. Ricurvo, s, *N. otophora*. Diagonale, t, *N. bonariensis*. Ingrandimento (x): a-p, 1X; q-t, 1,5X. Da Goodspeed, 1954.

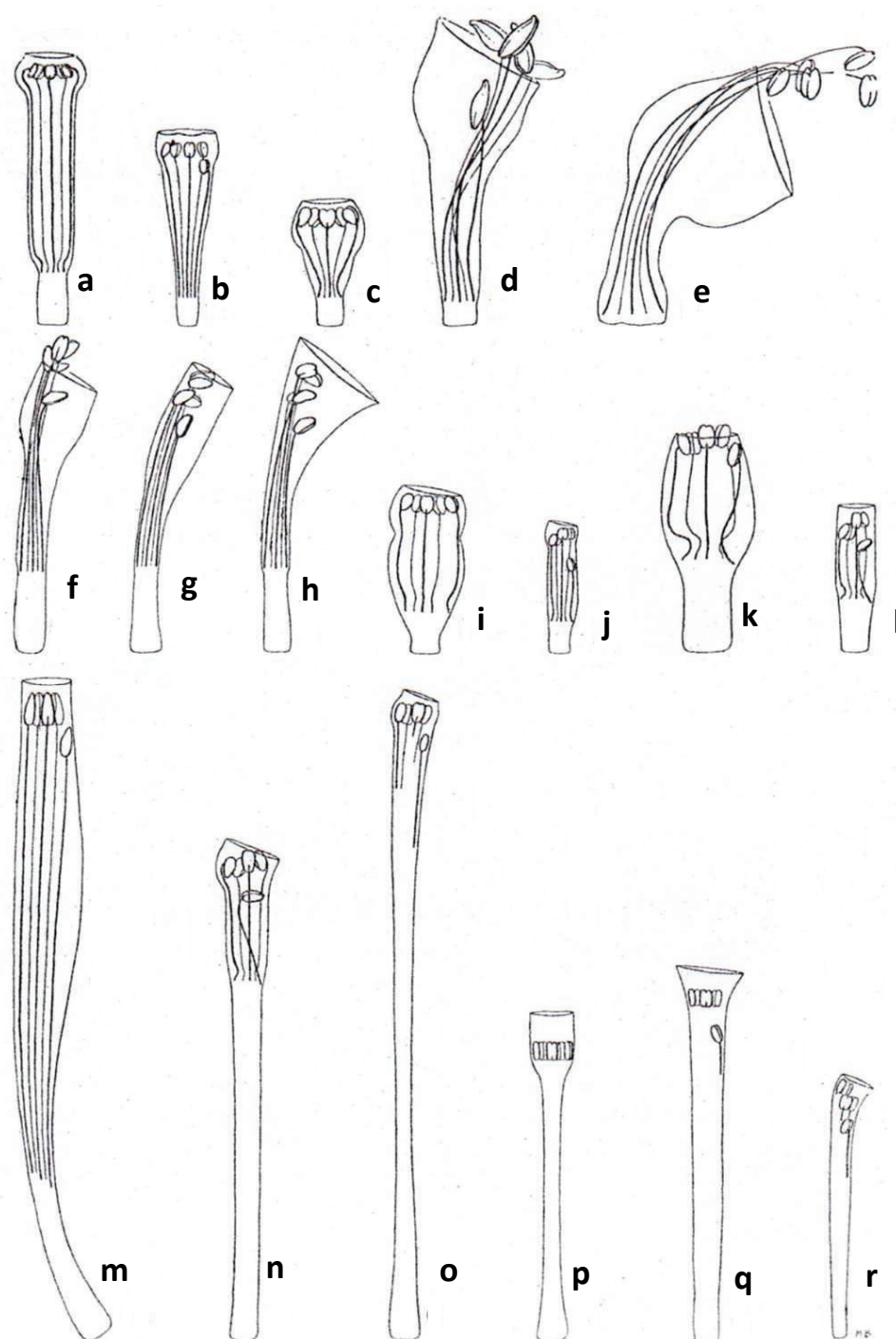


Figura 5. Parti tubulari della corolla in relazione all'inserzione dello stame. Tipo 1: a, *N. glauca*; b, *N. cordifolia*; c, *N. thyrsiflora*; i, *N. wigandioides*. Tipo 2: d, *N. setchellii*; e, *N. otophora*; f-h, *N. tabacum*. Tipo 3: j, *N. corymbosa*; n, *N. alata*. Tipo 4: k, l, *N. ameghinoi*. Tipo 5: m, *N. sylvestris*. Tipo 6: o, *N. longiflora*; p, *N. stocktonii*. Non classificati: q, *N. fragrans*; r, *N. occidentalis*. Ingrandimento: 1,25X, eccetto b, c, i-l, 1,75X. Da Goodspeed, 1954.

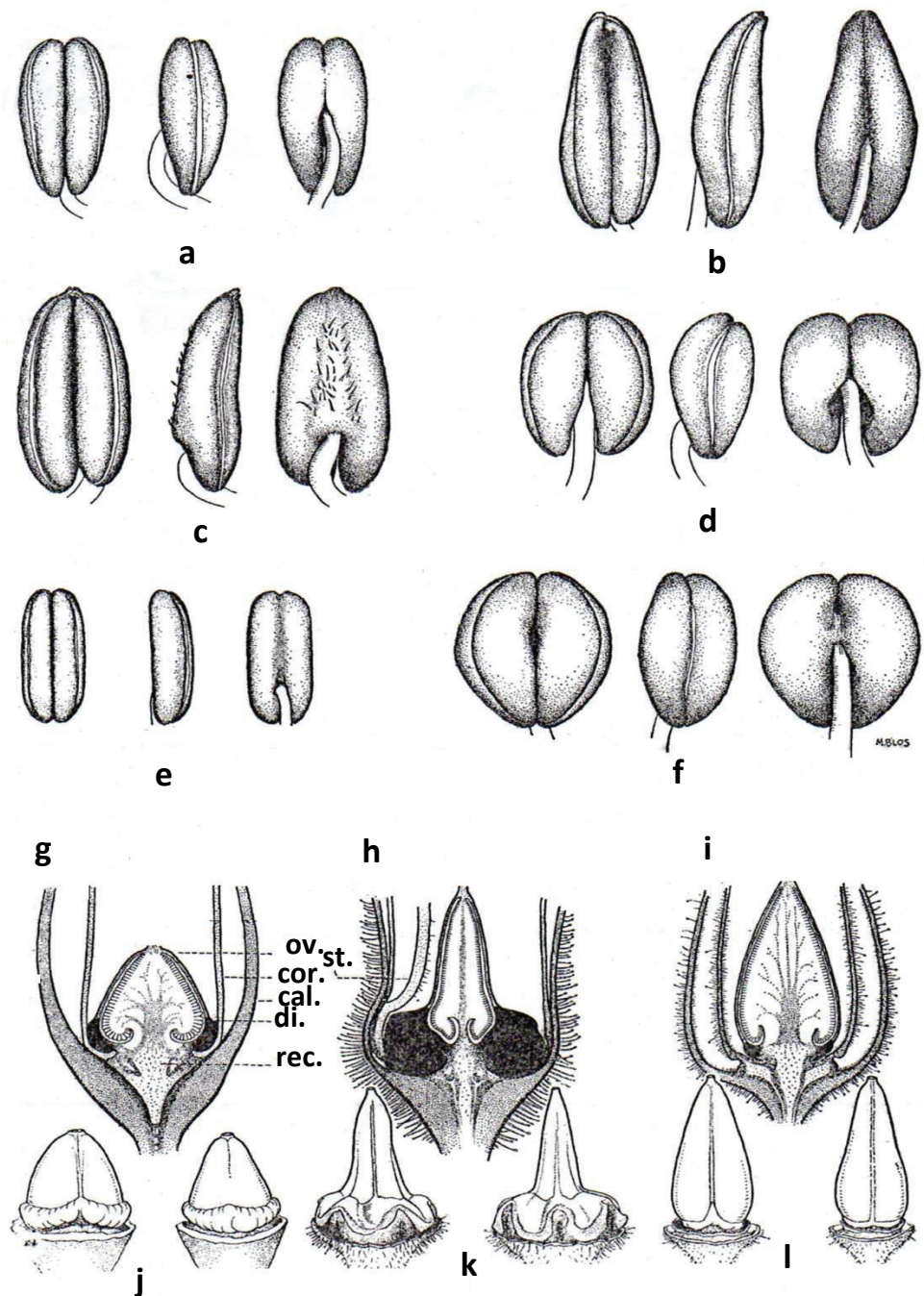


Figura 6. Tipi di antera e di ovario. Visione anteriore, laterale e posteriore dell'antera, mostrando l'attaccamento del filamento (Ingrandimento: 10X, eccetto b, c, 5X): a, *N. raimondii*; b, *N. setchellii*; c, *N. glutinosa*; d, *N. suaveolens*; e, *N. repanda*; f, *N. langsдорffii*. Sezione longitudinale della porzione più bassa del fiore (Ingrandimento: 5X): g, *N. glauca*; h, *N. tomentosa*; i, *N. sylvestris*. Ovario, disco anulare e ricettacolo (Ingrandimento: 4X). j, *N. glauca*; k, *N. tomentosa*; l, *N. sylvestris*. ov., ovario; cor., corolla; cal., calice; di., disco (nero in g-i); rec., ricettacolo; st. filamento dello stame. Da Goodspeed, 1954.

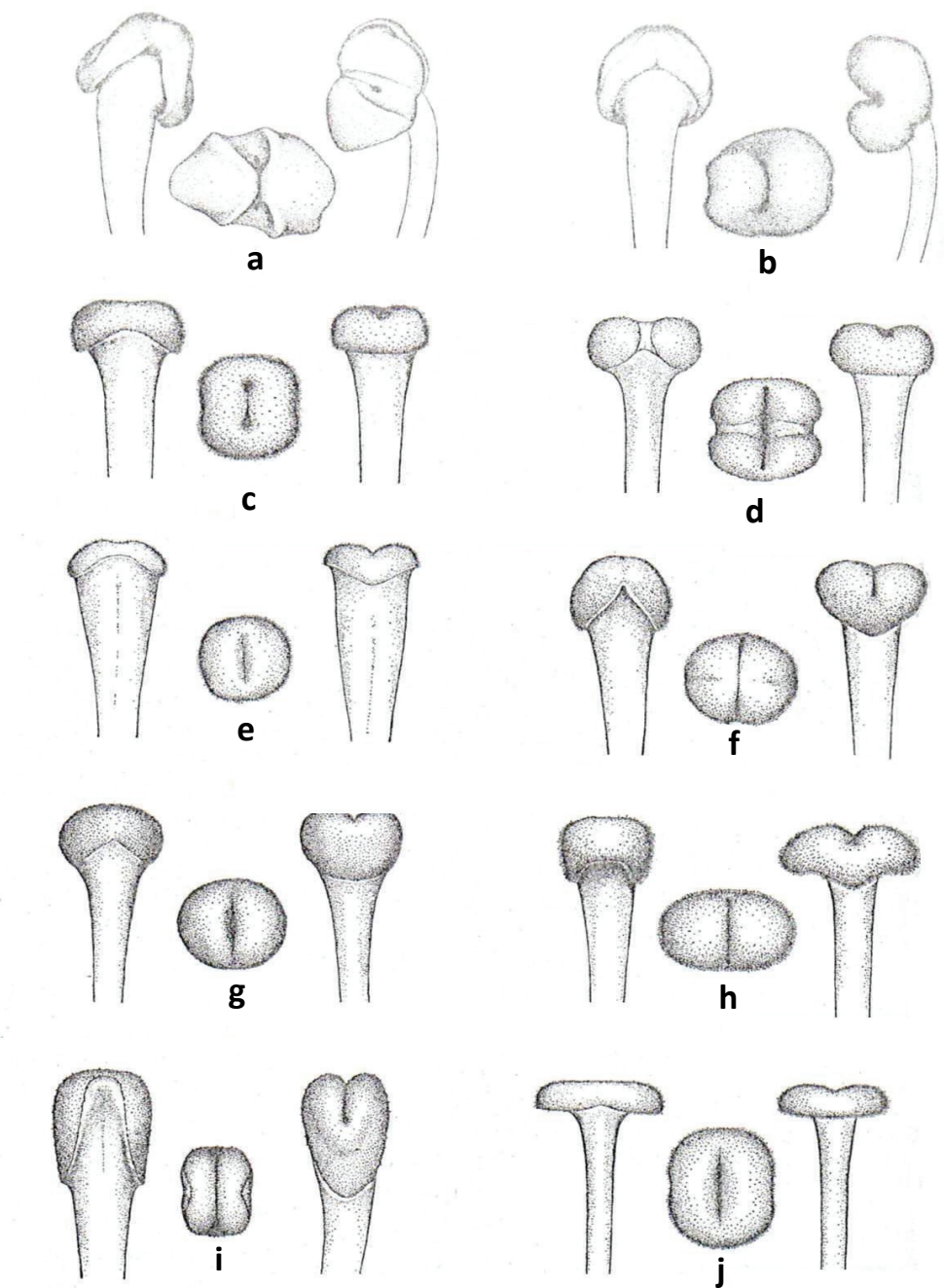


Figura 7. Tipi di stigma. a, *N. tomentosa*; b, *N. glutinosa*; c, *N. paniculata*; d, *N. undulata*; e, *N. bonariensis*; f, *N. sylvestris*; g, *N. repanda*; h, *N. pauciflora*; i, *N. trigonophylla*; j, *N. megalosiphon*. Ingrandimento: a, b, f, h, j, 10X; c-e, g, i, 15X. Da Goodspeed, 1954.

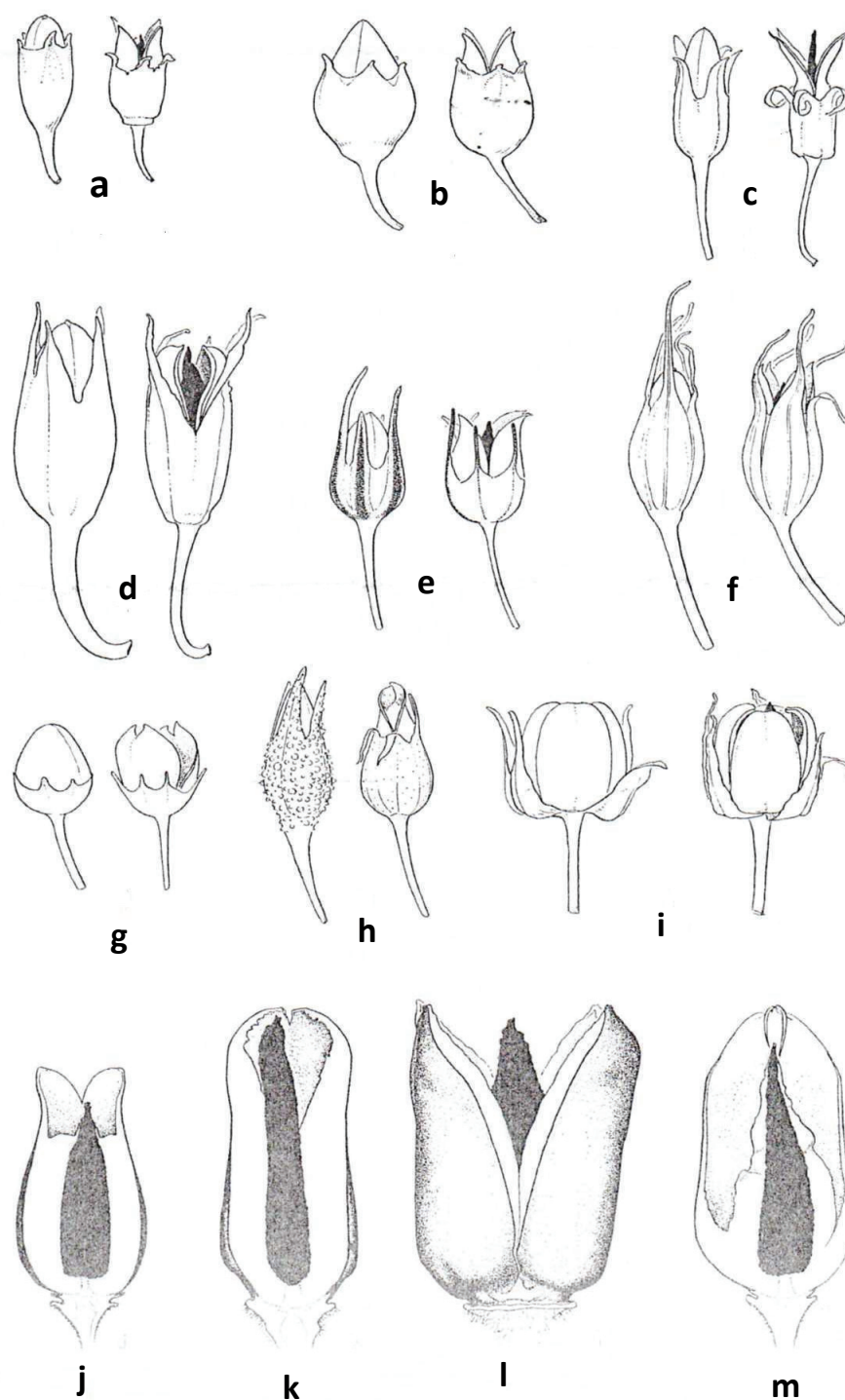


Figura 8. Forma e struttura delle capsule. Prima e dopo la deiscenza, a-i: a, *N. raimondii*; b, *N. benavidesii*; c, *N. tomentosiformis*; d, *N. setchellii*; e, *N. acuminata*; f, *N. alata*; g, *N. langsдорffii*; h, *N. bigevolii* var. *wallacei*; i, *N. bigevolii* var. *quadrivalvis*. Tipi di deiscenza, j-m: k, l, sezione e visione laterale di *N. tomentosa*; j, m, sezione di j, *N. paniculata* e m, *N. plumbaginifolia*. Ingrandimento: a-i, 1,5X; j-m, 4X. La zona in nero solido distingue la placenta dal setto. Da Goodspeed, 1954.

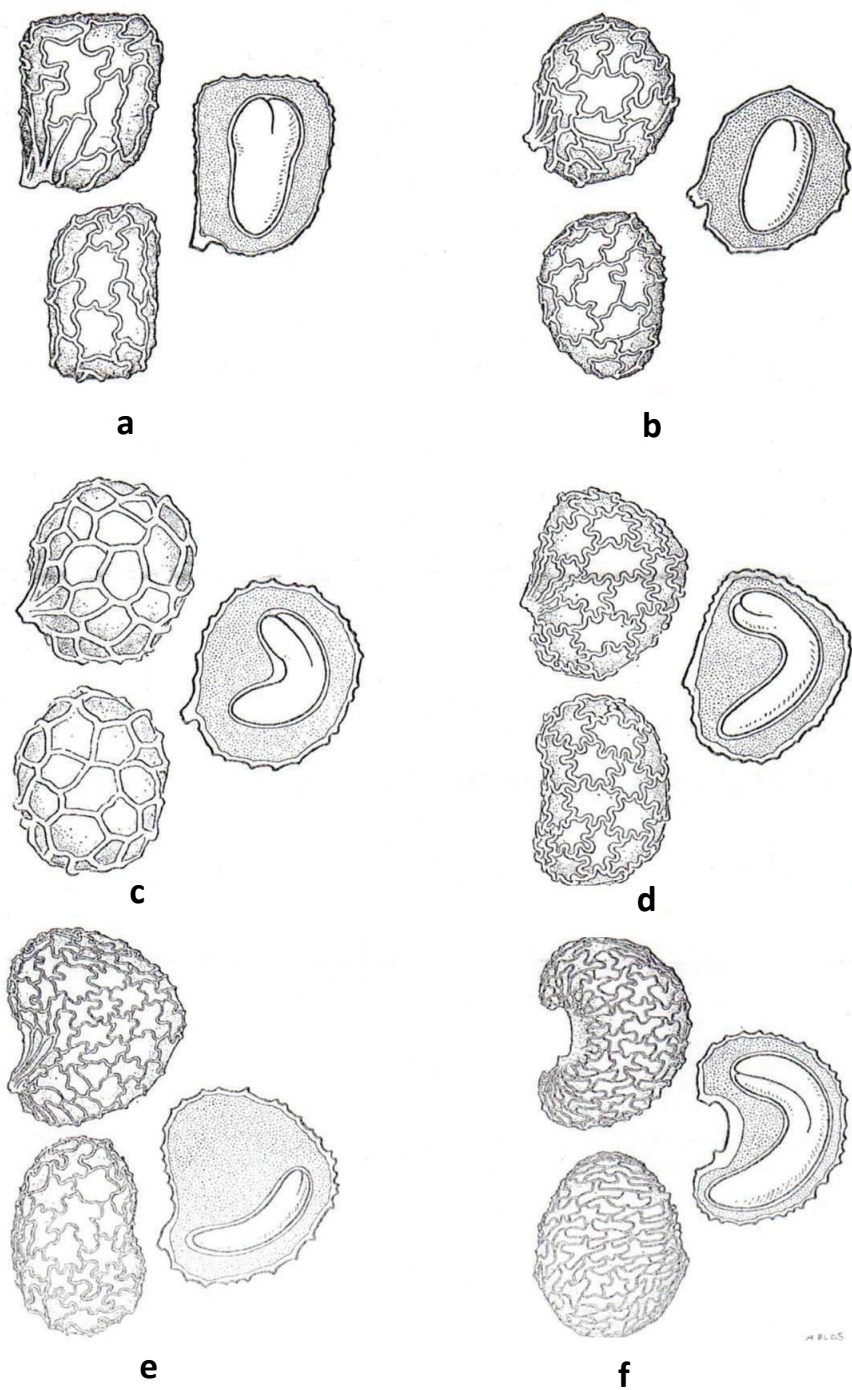


Figura 9. Tipi di seme e di embrione. Aspetto della superficie e sezione del seme: a, *N. paniculata*; b, *N. tomentosa*; c, *N. bonariensis*; d, *N. attenuata*; e, *N. noctiflora* var. *albiflora*; f, *N. velutina*. Ingrandimento: a, d, c, 30X; b, 50X; c, 37X; f, 25X. Da Goodspeed, 1954.

1.2 Cenni storici della classificazione del genere *Nicotiana*

La storia della classificazione del genere *Nicotiana* può essere divisa in quattro periodi: (1) dal XVI secolo alla definizione del genere *Nicotiana*, (2) da Linneo alla monografia del Comes risalente alla fine del XIX, (3) dalle pubblicazioni di Splendore e Anastasia dei primi anni del XX secolo alla monografia del Goodspeed, (4) dagli studi di Burbidge e Horton della seconda metà del XX secolo, alla recente revisione del genere *Nicotiana* proposta da Knapp.

Nel 1507 il cartografo Waldseemüller riferì circa l'usanza da parte delle popolazioni native dell'attuale America latina di inalare il fumo di foglie essiccate di una pianta denominata poi tabacco dagli spagnoli.

Nel 1554 Dodoens fornì un'illustrazione di una pianta chiamata "yellow henbane" (*Hyoscyamus*) che è una rappresentazione della *Nicotiana rustica* L. La denominazione di *Nicotiana* per la pianta di tabacco fu proposta dal naturalista e medico Lonicer Adam (1565) in omaggio a Jean Nicot, ambasciatore di Francia presso la corte del Portogallo, che fece conoscere ed apprezzare il tabacco come pianta medicamentosa.

Nel 1571 Monardes, medico di Siviglia scrisse un trattato riguardante le proprietà curative della pianta introdotta da poco in Europa. Le specie allora note erano la *N. tabacum*, la *N. rustica* e la *N. paniculata*. La *N. tabacum* era denominata "*Nicotiana major*", la *N. rustica* e la *N. paniculata* erano denominate "*Nicotiana minor*" (Lattanzi, 1957).

Nel 1753 Linneo descrisse nella prima edizione del suo lavoro "Species plantarum" quattro specie di *Nicotiana*, tutte originarie del Sud-America, la *N. glutinosa*, la *N. paniculata*, la *N. rustica* e la *N. tabacum*, alle quali aggiunse nella seconda edizione del 1762 tre specie, la *N. fruticosa*, la *N. pusilla* e la *N. urens*. Nel 1818 Lehmann pubblicò il trattato che rappresenta la prima monografia del genere "*Generis Nicotianarum Historia*" in cui vengono descritte 21 specie (Goodspeed, 1954). La prima classificazione del genere *Nicotiana* con suddivisione in sezioni fu proposta nel 1838 dal botanico Don. Egli basandosi sulla forma e colore della corolla, raggruppò le diverse *Nicotianae* conosciute nelle seguenti quattro sezioni: la Sectio *Tabacum*, la Sectio *Rustica*, la Sectio

Petunioides e la Sectio *Polydiclia*. Nel 1852 Dunal propose per le specie del genere *Nicotiana* la suddivisione in due sezioni: *Didiclia*, con le tre sottosezioni *Tabacum*, *Rustica* e *Petunoides*, e la sezione *Polydiclia*. Tale ordinamento sistematico non differisce sostanzialmente da quello del Don. Nel 1895 Wettstein abolì la sezione *Polydiclia* includendo le specie di questa sezione nella sezione *Petunoides*. In seguito, il Comes, che si occupò estesamente della classificazione botanica dei tabacchi e delle *Nicotianae*, introdusse nella sua monografia del genere *Nicotiana* (1899) un ordinamento più scientifico e più completo delle diverse specie e varietà conservando le quattro sezioni del Don (Goodspeed, 1954). Dopo la monografia del Comes, nei primi anni del XX secolo estesi lavori sulla sistematica del genere *Nicotiana* furono pubblicati da Splendore (1906) e Anastasia (1914). Il primo autore usò la morfologia dei granuli pollinici e dei semi per determinare il grado di relazione fra le specie, mentre il secondo autore mise in rilievo la morfologia degli organi femminili di riproduzione quale carattere importante per determinare il grado di differenza nelle specie. Successivamente lavori sull'ordinamento sistematico del genere *Nicotiana* furono pubblicati da Setchell (1912), Millán (1926,1928), East (1928) per quanto riguarda le specie americane e da Domin (1929), Black (1915-37) e Wheeler (1935,1945) relativamente alle specie dell'Australia e del Sud Pacifico. Nei lavori di Setchell (1912) sono state descritte diverse varietà di *N. tabacum* e di *N. rustica* e illustrate in dettaglio. In particolare Millán (1926,1928) descrisse le specie di origine argentina e Macbride (1930) e Goodspeed (1933a, 1938, 1941a, 1944) quelle originarie del Perù e della Bolivia. In diversi lavori, Black (1915-37), Domin (1929) e Wheeler (1935) descrissero le specie dell'Australia e del Sud Pacifico. East, Kostoff e Goodspeed esaminarono le specie sia dal punto di vista morfologico che citogenetico. Nel 1943, Kostoff compilò una classificazione in base ai caratteri morfologici, a studi di citogenetica ed alla distribuzione geografica delle specie del genere *Nicotiana*. In questa classificazione le specie erano distinte in americane e australiane. Le specie americane erano poi divise in 7

sezioni o gruppi genetici, mentre le specie australiane erano raggruppate in un'unica sezione. Come nella classificazione del Kostoff anche nella classificazione del Goodspeed del 1945 le specie erano distinte in americane e australiane. Le specie americane erano comprese in dieci sezioni, delle quali alcune hanno corrispondenza con quella della classificazione del Kostoff, mentre le specie australiane erano riunite in un'unica sezione (undicesima). Le undici sezioni erano raggruppate in tre sottogeneri; *Rustica*, *Tabacum* e *Petunioides*. In seguito ad ulteriori studi nel 1954 Goodspeed pubblicò una dettagliata monografia del genere, relativa alle 60 specie allora note, dividendole in 3 subgeneri e 14 sezioni (Tabella 1), basandosi su evidenze morfologiche, citologiche, sulla distribuzione geografica e su esperimenti d'incrocio tra le specie.

Tabella 1. Classificazione del genere *Nicotiana* secondo Goodspeed (1954).

Subgenere	Sezione	Specie	Authorities
<i>Rustica</i>	<i>Paniculatae</i>	<i>N. glauca</i>	Graham
		<i>N. paniculata</i>	Linnaeus
		<i>N. knightiana</i>	Goodspeed
		<i>N. solanifolia</i>	Walpers
		<i>N. benavidesii</i>	Goodspeed
		<i>N. cordifolia</i>	Philippi
		<i>N. raimondii</i>	Macbride
	<i>Thyrsiflorae</i>	<i>N. thyrsiflora</i>	Bitter ex Goodspeed
	<i>Rusticae</i>	<i>N. rustica</i>	Linnaeus
<i>Tabacum</i>	<i>Tomentosae</i>	<i>N. tomentosa</i>	Ruiz & Pavon
		<i>N. tomentosiformis</i>	Goodspeed
		<i>N. otophora</i>	Grisebach
		<i>N. setchellii</i>	Goodspeed
		<i>N. glutinosa</i>	Linnaeus
	<i>Genuinae</i>	<i>N. tabacum</i>	Linnaeus
<i>Petunoides</i>	<i>Undulatae</i>	<i>N. undulata</i>	Ruiz & Pavon
		<i>N. arentsii</i>	Goodspeed
		<i>N. wigandioides</i>	Koch & Fintelmann
	<i>Trigonophyllae</i>	<i>N. trigonophylla</i>	Dunal
		<i>N. palmeri</i>	Gray
	<i>Alatae</i>	<i>N. sylvestris</i>	Spegazzini & Comes
		<i>N. langsdorffii</i>	Weinmann
		<i>N. alata</i>	Link & Otto
		<i>N. forgetiana</i>	Hort ex Hemsley
		<i>N. bonariensis</i>	Lehmann
		<i>N. longiflora</i>	Cavanilles
		<i>N. plumbaginifolia</i>	Viviani
	<i>Repandae</i>	<i>N. repanda</i>	Willdenow ex Lehmann
		<i>N. stocktonii</i>	Brandegee
		<i>N. nesophila</i>	Johnston
	<i>Noctiflorae</i>	<i>N. noctiflora</i>	Hooker
		<i>N. petunoides</i>	(Grisebach) Millán
		<i>N. acaulis</i>	Spegazzini
		<i>N. ameghinoi</i>	Spegazzini
	<i>Acuminatae</i>	<i>N. acuminata</i>	(Graham) Hooker
		<i>N. pauciflora</i>	Remy
		<i>N. attenuata</i>	Torrey ex Watson

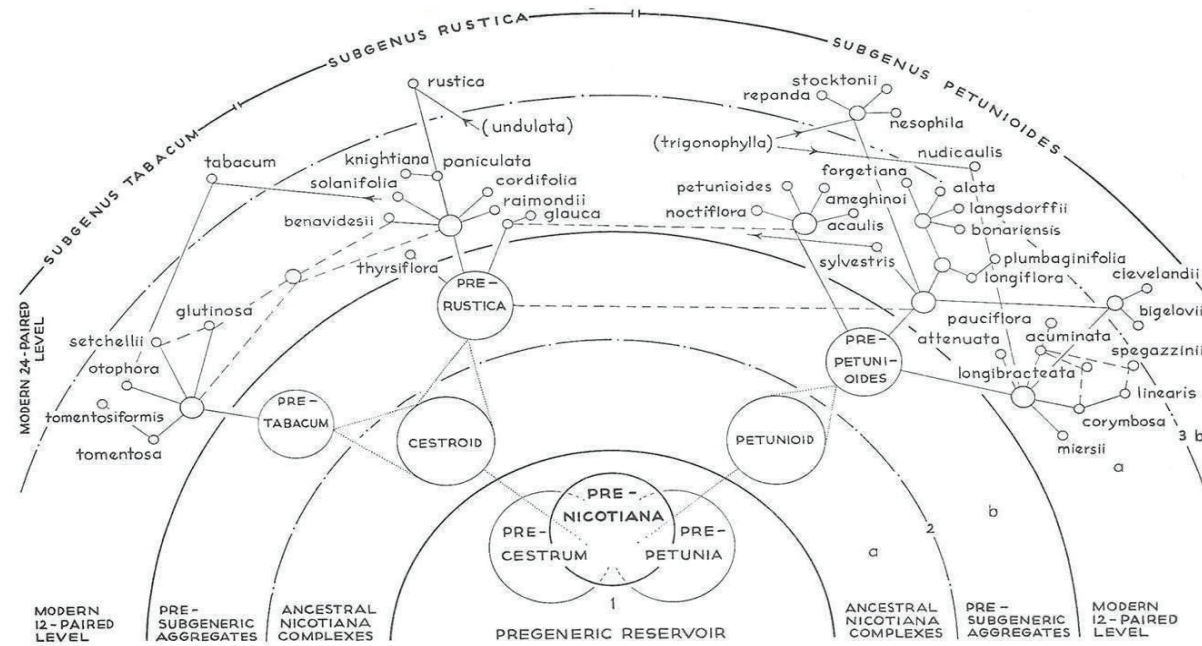
	<i>N. longibracteata</i>	Philippi
	<i>N. miersii</i>	Remy
	<i>N. corymbosa</i>	Remy
	<i>N. linearis</i>	Philippi
	<i>N. spegazzini</i>	Millán
<i>Bigelovianae</i>	<i>N. bigelovii</i>	Torrey (Watson)
	<i>N. clevelandii</i>	Gray
<i>Nudicaules</i>	<i>N. nudicaulis</i>	Watson
<i>Suaveolentes</i>	<i>N. benthamiana</i>	Domin
	<i>N. debneyi</i>	Domin
	<i>N. excelsior</i>	(J.M. Black)J. M. Black
	<i>N. exigua</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. fragrans</i>	Hooker
	<i>N. goodspeedii</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. gossei</i>	Domin
	<i>N. ingulba</i>	J.M. Black
	<i>N. maritima</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. megalosiphon</i>	Van Heurck and Müll.
	<i>N. occidentalis</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. rotundifolia</i>	Lindley
	<i>N. stenocarpa</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. suaveolens</i>	Lehmann
	<i>N. velutina</i>	H. M. Wheeler

Nel ricostruire la storia dell'evoluzione del genere *Nicotiana*, Goodspeed (1954) ipotizzò che due pool ancestrali di geni, chiamati “pre-petunoidi” e “pre-cestroidi”, avevano dato origine a due distinte discendenze. Egli suppose che l'intero genere fosse costituito di specie con livello poliploide primario $n=12$ o secondario $n=24$ derivati da un taxon ancestrale estinto con numero cromosomico $n=6$ (Figura 10), mettendo in rilievo il ruolo del raddoppiamento cromosomico e dell'ibridazione nell'evoluzione del genere. Individuò strette relazioni come ad esempio, tra la sezione *Rusticae* e quella *Paniculatae*, tra la sezione *Undulatae* con la sezione *Paniculatae* e tra la sezione *Alatae* e la sezione *Suaveolentes* (Figura 11). Egli ipotizzò che le specie appartenenti a tale sezione si fossero originate da un antico evento di ibridizzazione tra un membro delle *Alatae* e un altro genitore avente un pool genico derivante sia dalla sezione *Acuminatae* che dalla sezione *Noctiflorae* (Figura 12). Dopo l'autorevole monografia di Goodspeed (1954), sono state descritte altre 15 specie del genere *Nicotiana*, la maggior parte delle quali di origine australiana, incluse in successive revisioni tassonomiche da Burbidge (1960) e da Horton (1981).

Recentemente è stato proposto un nuovo schema tassonomico (Knapp et al., 2004) basato sui risultati ottenuti da recenti studi filogenetici condotti con tecniche di citogenetica e sistematica molecolare (Aoki and Ito., 2000, Chase et al., 2003, Clarkson et al., 2004) e tenendo conto delle odierne regole del Codice Internazionale di Nomenclatura Botanica (Greuter, 2000). La tassonomia del genere riportata da Goodspeed è confermata nella sua struttura generale, anche se vengono proposti alcuni cambiamenti di nomenclatura e di classificazione sezionale. Per esempio la *N. glutinosa* e la *N. thyrsiflora* nella nuova classificazione sono state assegnate alla *N. sect. Undulatae*, inserite dal Goodspeed rispettivamente nella sezione *Tomentosae* e nella sezione *Thyrsiflorae*; la *N. glauca* che Goodspeed considerava appartenente alla *N. sect. Paniculatae*, è stata inclusa nella *N. sect. Noctiflorae*; la *N. sylvestris* che era stata inclusa dal Goodspeed nella *N. sect. Alatae* sia per i caratteri morfologici che per il

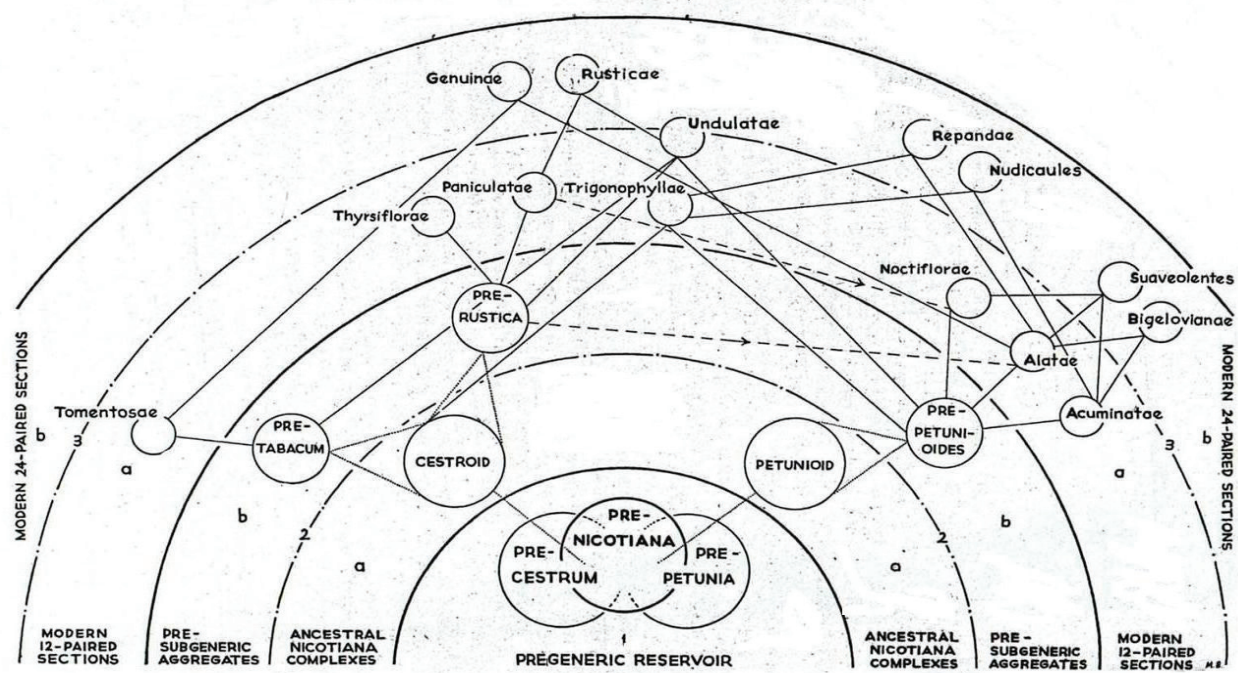
numero cromosomico, nell'attuale tassonomia del genere è stata collocata nella *N. sect. Sylvestres* come unico membro. In questa classificazione sezionale tutte le specie anfidiploidi sono state collocate in sezioni separate dai taxa loro progenitori, in quanto esse rappresentano la fusione di due distinti genomi. Queste interazioni genomiche creano nuovi tratti genetici permettendo l'ingresso delle specie in nuovi habitat (Kenton et al., 1993). In questo schema sono state unite la sezione *Repandae* e la sezione *Nudicaulis* in un'unica sezione, indicata come *Nicotiana sect. Repandae* in quanto i dati sul genoma nucleare e plastidiale indicano che essi condividono gli stessi due taxa parentali e sono pertanto un gruppo monofiletico. Alle denominazioni delle sezioni sono stati apportati cambiamenti in accordo al Codice Internazionale di Nomenclatura Botanica (Greuter & al., 2000). In particolare la sezione *Genuinae* di Goodspeed contenente il tipo rappresentativo del genere, la *N. tabacum*, è stata rinominata *Nicotiana sect. Nicotiana*. Per il criterio di priorità il nome corretto della *N. sect. Acuminatae* del Goodspeed è *N. sect. Petunioides*, e della *N. sect. Bigevolianae* è *N. sect. Polydicliae*. Nella recente revisione proposta da Knapp sono state incluse altre 10 specie successivamente scoperte per la maggior parte in Australia, appartenenti alla sezione *Suaveolentes*.

Secondo Knapp il genere *Nicotiana* è costituito da 76 specie divise in 13 sezioni (Tabella 2).



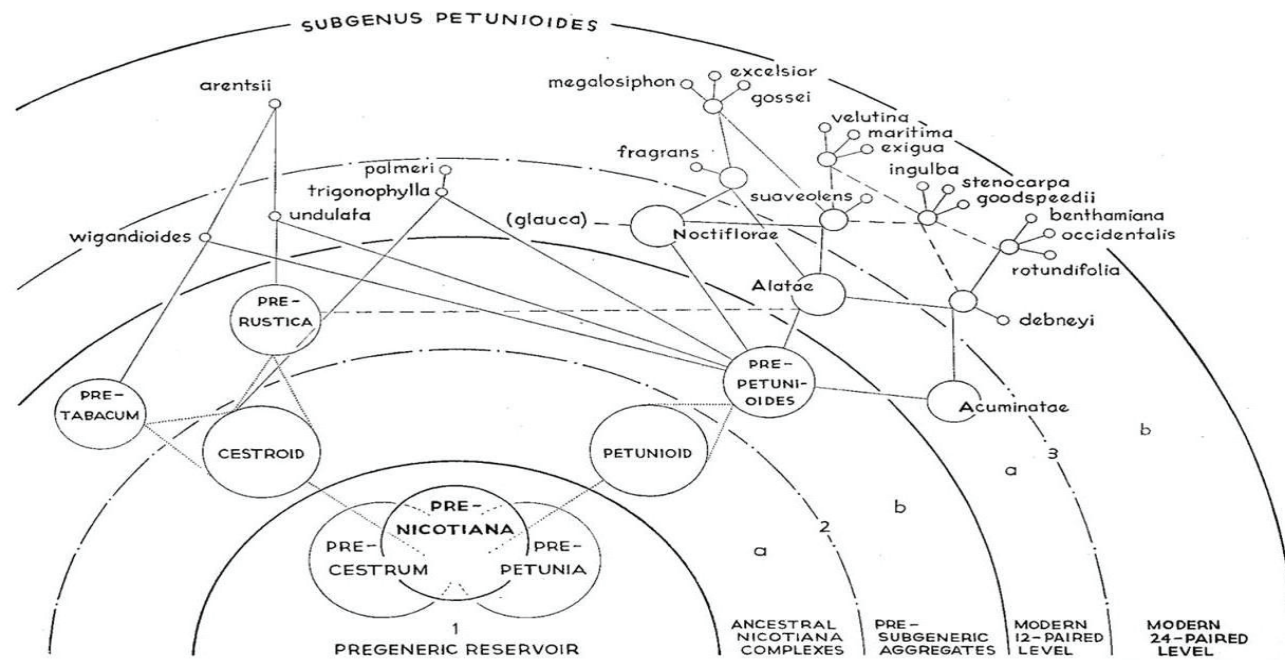
Goodspeed, 1954

Figura 10. Diagramma filogenetico del genere *Nicotiana*.



Goodspeed, 1954

Figura 11. Diagramma filogenetico delle 14 sezioni del genere *Nicotiana*.



Goodspeed, 1954

Figura 12. Diagramma filogenetico del genere *Nicotiana*.

Tabella 2. Classificazione del genere *Nicotiana* secondo Knapp (2004).

Sezione	Specie	Authorities
<i>Paniculatae</i>	<i>N. benavidesii</i>	Goodspeed
	<i>N. cordifolia</i>	Philippi
	<i>N. cutleri</i>	D'Arcy
	<i>N. Knightiana</i>	Goodspeed
	<i>N. paniculata</i>	Linneaus
	<i>N. raimondii</i>	J.F. Macbridge
	<i>N. solanifolia</i>	Walp.
<i>Rusticae</i>	<i>N. rustica</i>	Linnaeus
<i>Tomentosae</i>	<i>N. kawakamii</i>	Y. Ohashi
	<i>N. otophora</i>	Griseb.
	<i>N. setchellii</i>	Goodspeed
	<i>N. tomentosa</i>	Ruiz & Pavon
	<i>N. tomentosiformis</i>	Goodspeed
<i>Nicotiana</i>	<i>N. tabacum</i>	Linnaeus
<i>Undulatae</i>	<i>N. undulata</i>	Ruiz & Pavon
	<i>N. glutinosa</i>	Linneaus
	<i>N. thyrsiflora</i>	Bitter ex Goodspeed
	<i>N. arentsii</i>	Goodspeed
	<i>N. wigandioides</i>	Koch & Fintelmann
<i>Trigonophyllae</i>	<i>N. obtusifolia</i>	M. Martens and Galeotti
	<i>N. palmeri</i>	Gray
<i>Sylvestres</i>	<i>N. sylvestris</i>	Spegazzini and Comes
<i>Alatae</i>	<i>N. langsdorffii</i>	Weinmann
	<i>N. alata</i>	Link & Otto
	<i>N. mutabilis</i>	Stehmann and Samir
	<i>N. forgetiana</i>	Hort ex Hemsley
	<i>N. bonariensis</i>	Lehmann
	<i>N. longiflora</i>	Cavanilles
	<i>N. azambujae</i>	L.B. Smith and Downs
	<i>N. plumbaginifolia</i>	Linneaus
<i>Polydicliae</i>	<i>N. clevelandii</i>	A. Gray
	<i>N. quadrivalvis</i>	Pursh
<i>Repandae</i>	<i>N. repanda</i>	Willdenow ex Lehmann
	<i>N. stocktonii</i>	Brandege
	<i>N. nudicaulis</i>	S. Watson
	<i>N. nesophila</i>	I.M. Johnston
<i>Noctiflorae</i>	<i>N. noctiphora</i>	Hooker

	<i>N. glauca</i>	Graham
	<i>N. petunoides</i>	(Grisebach) Millán
	<i>N. acaulis</i>	Spegazzini
	<i>N. paa</i>	Mart. Crov.
	<i>N. ameghinoi</i>	Spegazzini
<i>Petunoides</i>	<i>N. acuminata</i>	(Graham)
	<i>N. pauciflora</i>	Remy
	<i>N. attenuata</i>	Torrey ex Watson
	<i>N. longibracteata</i>	Philippi
	<i>N. miersii</i>	Remy
	<i>N. corymbosa</i>	Remy
	<i>N. linearis</i>	Philippi
	<i>N. spegazzini</i>	Millán
<i>Suaveolentes</i>	<i>N. benthamiana</i>	Domin
	<i>N. debneyi</i>	Domin
	<i>N. excelsior</i>	(J.M. Black) J. M. Black
	<i>N. exigua</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. fragrans</i>	Hooker
	<i>N. goodspeedii</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. gossei</i>	Domin
	<i>N. ingulba</i>	J.M. Black
	<i>N. maritima</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. megalosiphon</i>	Van Huerck and Müll.
	<i>N. occidentalis</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. rotundifolia</i>	Lindl.
	<i>N. stenocarpa</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. suaveolens</i>	Lehmann
	<i>N. velutina</i>	H. M. Wheeler
	<i>N. africana</i>	Merxm.
	<i>N. amplexicaulis</i>	N.T. Burb.
	<i>N. burbridgeae</i>	Symon
	<i>N. cavicola</i>	N.T. Burb.
	<i>N. hesperis</i>	N.T. Burb.
	<i>N. heterantha</i>	Kenneally and Symon
	<i>N. rosulata</i>	(S. Moore) Domin
	<i>N. simulans</i>	N.T. Burb.
	<i>N. truncata</i>	D.E. Symon
	<i>N. umbratica</i>	N.T. Burb.
	<i>N. wuttkei</i>	Clarkson and Symon

1.3 Descrizione delle sezioni del genere *Nicotiana* (Knapp, 2004)

Sezione Paniculatae

Piante erbacee vigorose o piante sub arborescenti, con foglie picciolate. Fiori con corolla actinomorfa, tubulosa, con lobi di colore giallastro o verdastro, piccoli e fioritura diurna. Numero cromosomico $n=12$. La zona di origine è la parte occidentale dell'America del Sud. La sezione comprende 7 specie (Tabella 2).

Sezione Rusticae

Comprende un'unica specie erbacea, la *N. rustica* generalmente molto vigorosa, con foglie picciolate. Il fiore ha la corolla actinomorfa o leggermente zigomorfa, con lobi di colore giallo verdastro. I fiori sono diurni. Numero cromosomico: $n=24$. Zona di origine: Ande. La specie è naturalizzata in tutto il mondo (Tabella 2).

Sezione Tomentosae

Piante sub arborescenti, con foglie sessili. I fiori hanno corolla zigomorfa, a tubo incurvato, con lobi acuti di colore che varia dal rosso al rosato. I fiori sono diurni o parzialmente notturni. Numero cromosomico: $n=12$. Zona di origine: Ande, dal Perù all'Argentina. La sezione comprende 5 specie (Tabella 2).

Sezione Nicotiana

Comprende una sola specie erbacea il tabacco (*N. tabacum* L.), generalmente molto vigorosa, con foglie sessili. La corolla è solitamente regolare di colore rosa, ma può variare dal bianco a rosso e presenta lobi acuti. I fiori sono diurni. Numero cromosomico $n=24$. Zona di origine: Ande. La specie è naturalizzata in tutto il mondo (Tabella 2).

Sezione *Undulatae*

Piante erbacee, o sub arborescenti con foglie sessili o picciolate. La corolla zigomorfa o quasi regolare con lobi acuti di colore giallo, rosa o bianco. I fiori sono diurni. Numero cromosomico: $n=12$. Zona di origine: Ande, Ecuador e Bolivia. La sezione comprende 5 specie (Tabella 2).

Sezione *Trigonophyllae*

Piante erbacee, annuali o perenni, con foglie sessili. Il fiore ha corolla regolare con lobi di colore bianco o verdastro. I fiori sono diurni. Numero cromosomico: $n=12$. Le zone di origine sono la parte sud-occidentale degli Stati Uniti e Messico. La sezione comprende 2 specie (Tabella 2).

Sezione *Sylvestres*

La sezione include una sola specie, la *N. sylvestris*, pianta erbacea robusta con foglie larghe, che formano una rosetta basale, quando la pianta è giovane. Le foglie sono alate o auricolate. La corolla è regolare, bianca con tubo corollino lungo e lobi acuti; i fiori sono aperti di giorno. Numero cromosomico: $n=12$. Zona di origine: Ande, dalla Bolivia all'Argentina (Tabella 2).

Sezione *Alatae*

Piante erbacee annuali con foglie generalmente sessili e nella parte inferiore della pianta disposte a rosetta. Il fiore vespertino, ha la corolla zigomorfa, di colore bianco o dal rosa al rosso. Solo la *N. langsdorffii* presenta fiori giallo-verdastri, aperti di giorno con antere porpora e polline blu. Numero dei cromosomi: $n=9, 10$. Zona di origine: Messico, Uruguay. La sezione comprende 8 specie (Tabella 2).

Sezione *Polydichiae*

Piante annuali erbacee con foglie basali con corto picciolo e con foglie superiori spesso sessili, scarsamente pubescenti. I fiori presentano corolla regolare, bianca con lobi acuti e tubo corollinico diritto. La fioritura è

vespertina. Numero cromosomico: $n=24$. Zona di origine: Sud-ovest degli Stati Uniti e Messico. La sezione comprende 2 specie (Tabella 2).

Sezione *Repandae*

Piante a rosetta basale con foglie con lungo picciolo finemente pubescenti. I fiori presentano corolla regolare o qualche volta zigomorfa, bianca con i lobi acuti. La fioritura è diurna (*N. nudicaulis*) o vespertina. Numero cromosomico: $n=24$. Zona di origine: Sud-ovest degli Stati Uniti e Messico settentrionale. La sezione comprende 4 specie (Tabella 2).

Sezione *Noctiflorae*

Piante erbacee con foglie sessili o picciolate. Il fiore ha corolla regolare, e lobi di colore bianco, giallo o roseo. La *Nicotiana acaulis* ha un fusto molto ridotto con foglie disposte a rosetta. I fiori sono diurni o vespertini. Numero cromosomico: $n=12$. Zona di origine: Argentina e Cile. La sezione comprende 6 specie (Tabella 2).

Sezione *Petunioides*

Piante erbacee annuali, con foglie picciolate alate. Il fiore ha corolla regolare o lievemente zigomorfa, con lobi acuti di colore bianco. I fiori sono vespertini. Numero cromosomico: $n=12$. Zona di origine: Sud-ovest degli Stati Uniti e della parte meridionale del Sud America. La sezione comprende 8 specie (Tabella 2).

Sezione *Suaveolentes*

Piante annuali (ad eccezione della *N. fragrans* che è perenne) con foglie sessili o picciolate alate. Le foglie basali sono disposte a rosetta da cui si diparte un fusto che ramificandosi termina con una infiorescenza generalmente a pannocchia. Il fiore è vespertino ed ha la corolla zigomorfa o talvolta regolare, con lobi di colore bianco. Numero cromosomico: $n=16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24$. Zona di origine: Australia, Nuova Caledonia, Namibia. La sezione comprende 26 specie (Tabella 2).

1.4 Biogeografia delle sezioni del genere *Nicotiana*

Le specie della sezione *Tomentosae* del genere *Nicotiana* sono native della parte orientale delle Ande, che si estende dal nord del Perù all'Argentina dove le specie crescono ad alta quota.

Le specie della sezione *Trigonophyllae* del genere *Nicotiana* si ritrovano nella parte occidentale dell'America del Nord, dove si presume siano giunti dalle Ande i loro antenati, e vivono in habitat aridi (a Death Valley in California, per esempio) a diverse quote.

Le specie della sezione *Undulatae* si ritrovano principalmente nella zona orientale delle Ande in particolare dall'Ecuador alla Bolivia meridionale, dove le specie crescono a quote elevate in habitat diversi. Il gruppo della sezione *Paniculatae*, si ritrova nella zona occidentale delle Ande che si estende dal Perù alla Bolivia, generalmente le specie crescono a bassa quota in habitat umidi o ad alta quota o in foreste aride. La *N. cordifolia* si ritrova nell'isola di Masafuera (isole di Juan Fernández-Cile).

Le specie della sezione *Petuniodes* si ritrovano nella zona meridionale delle Ande, dal Nord del Cile fino alla Patagonia, a varie altitudini dal livello del mare fino ad alta quota. La *Nicotiana attenuata* si trova invece nella parte occidentale del Nord America.

Le specie della sezione *Noctiflorae* si ritrovano nella zona meridionale delle Ande, dall'Argentina al Cile fino alla Patagonia sia a bassa che ad alta quota su entrambi i versanti delle Ande. Tra le specie di questa sezione, la *Nicotiana glauca* è una pianta infestante e naturalizzata in tutto il mondo, ma il cui luogo d'origine è probabilmente l'Argentina settentrionale o la Bolivia meridionale.

La sezione *Sylvestres* è costituita dalla sola *N. sylvestris*, originaria del versante orientale delle Ande, nella zona compresa tra la Bolivia meridionale e l'Argentina settentrionale dove vive a quote moderate.

La sezione *Alatae* è costituita da piante che si ritrovano principalmente sul versante orientale delle Ande centrali fino al Brasile sud-orientale ed all'Uruguay. La *N. plumbaginifolia* si trova invece negli Stati Uniti fino all'Argentina e al Brasile, ed è la più diffusa delle specie diploidi del genere *Nicotiana*.

La sezione *Polydicliae* si trova nei deserti della zona occidentale del Nord-America. La *Nicotiana quadrivalvis* era la specie utilizzata come tabacco dalle tribù indiane dei territori compresi dal Nord Dakota degli Stati Uniti al Texas fino alla California. E' stata diffusamente coltivata fino alla regione costiera della Colombia Britannica (Canada).

Le specie della sezione *Repandae* mostrano una distribuzione discontinua; la *N. repanda* si ritrova principalmente nella zona orientale del Messico settentrionale e nella zona meridionale del Texas, sia all'interno che sulla costa; la *N. stocktonii* e la *N. nesophila* si ritrovano in isole diverse dell'arcipelago della Riviera Gipeo ad ovest del Messico.

La distribuzione "bimodale" delle specie diploidi lascia perplessi perché nessuna specie è nativa dell'America centrale, ad eccezione forse per la *N. plumbaginifolia*, che potrebbe essere stata introdotta solo successivamente nella regione. Molte specie sono giunte chiaramente in Messico e nel Nord America mediante dispersioni a lunghe distanze provenienti dalle Ande, dove sono distribuite le rimanenti specie. In alternativa, il genere potrebbe essere stato in passato ampiamente distribuito in tutta l'America e che la sua attuale distribuzione disgiunta sia il risultato di una estinzione del genere in America centrale. Poiché la più grande diversità di specie si trova nella parte orientale delle Ande, sembra più plausibile ipotizzare che questo sia il luogo in cui il genere si è evoluto e da qui si sia diffuso con movimenti a breve e a lunga distanza che hanno determinato la loro attuale distribuzione. In particolare almeno una volta si possono ipotizzare i movimenti verso le Ande occidentali (sezione *Paniculatae*), verso il Brasile (sezione *Alatae*) e il movimento dalle Ande al Nord America in diverse occasioni. Per alcune specie che si trovano nelle zone più meridionali dell'America del sud (Patagonia) è ipotizzabile la via costiera per il raggiungimento delle pendici occidentali delle Ande (sezione *Noctiflorae* e *Petunioides*).

1.5 Sezione *Suaveolentes*

Le specie di *Nicotiana* dell'Australia e di alcune isole dell'Oceano Pacifico meridionale sono tutti membri della sezione *Suaveolentes* del subgenere *Petunioides*.

Tale sezione è caratterizzata dall'avere il lembo della corolla non deflesso, la gola della corolla non dilatata o, poco dilatata in qualche specie, e di presentare l'antera posta più in basso sul filamento più lungo (ad eccezione della *N. debneyi*).

Nel 1935 Wheeler fece una prima descrizione dettagliata delle specie australiane riconosce 15 specie australiane tra le quali 6 nuove e nel 1945 Goodspeed approfondì tale studio da un punto di vista della caratterizzazione cromosomica. Egli considerò le 15 specie australiane e del sud Pacifico allora note come un unico gruppo genetico che designò come sezione *Suaveolentes* del subgenere *Petunioides*. Nella sua monografia del genere *Nicotiana* del 1954 egli descrisse ampiamente la sezione sulla base dei lavori di Wheeler.

Una revisione delle specie australiane del genere *Nicotiana* fu poi pubblicata da Burbidge (1960), che incluse la descrizione di 5 nuove specie: *N. umbratica*, *N. cavicola*, *N. hesperis*, *N. simulans* e *N. amplexicaulis* e di 2 nuove sottospecie: *N. rotundifolia* subsp. *rotundifolia* e *N. rotundifolia* subsp. *aridicola*. Successivamente, nel 1981, Horton pubblicò una revisione tassonomica delle *Nicotianae* australiane includendo la descrizione di due nuove sottospecie la *N. debneyi* subsp. *monoschizocarpa* e la *N. megalosiphon* subsp. *sessilifolia*.

Nella recente revisione proposta da Knapp (2004) nella sezione sono incluse altre 10 specie successivamente scoperte.

Le specie australiane sono annuali o pluriennali. La maggior parte si può trovare in specifici habitat sabbiosi o rocciosi. In generale, esse crescono su aree con poca competizione con altre specie vegetali. La morfologia delle *Nicotianae* australiane può variare considerevolmente a seconda delle differenti condizioni ambientali. In condizioni sfavorevoli, la crescita è stentata con foglie piccole e strette e poco numerose, mentre in condizioni favorevoli con terreno umido e fertile, si sviluppano in maniera rigogliosa e

con foglie numerose e ampie. Anche il calice, le capsule e in particolare la corolla possono variare nelle dimensioni relative, in dipendenza dei fattori ambientali ed allo stadio fisiologico della pianta. Per esempio i tubi corollinici di fiori in piante che hanno concluso il ciclo vegetativo sono più piccoli rispetto a quelli delle piante in piena fioritura.

Il picciolo in tutte le *Nicotianae* australiane si presenta alato con una maggiore o minore estensione ed è continuo con la lamina fogliare. In questo modo il picciolo non è distinto dalla lamina fogliare eccetto, per esempio, in *Nicotiana cavicola* e *Nicotiana umbratica* che presentano foglie con base generalmente cordata. Il rivestimento dell'epidermide, dove è presente, consiste di tricomi multicellulari non ramificati, ghiandolari o privi di ghiandole; gli idatodi sono solitamente presenti. I tricomi ghiandolari sono di due tipi, uno terminante con una singola cellula globulare (testa-globulare) e l'altro con testa di forma ellittica costituita da diverse cellule (testa-ellissoidale). Il primo dei due rende le piante *in vivo* appiccicose al tatto, e il secondo tipo di tricoma le rende viscide al tatto. Questi tipi di tricoma sono illustrati in figura 13.

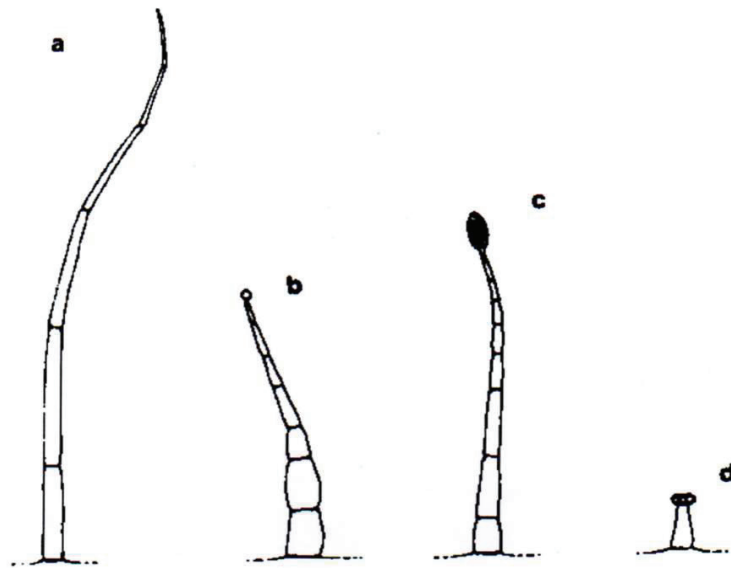


Figura 13. Tricomi delle *Nicotianae* Australiane. (a) privo di ghiandole; (b) ghiandolare, testa-globulare; (c) ghiandolare, testa-ellissoidale; (d) idatodo (Horton, 1981).

Il grado di pubescenza può variare considerevolmente in una specie o in una sottospecie. Per esempio per una specie pubescente, si può verificare di osservare campioni con fusto quasi glabro.

I pedicelli di *Nicotiana* si allungano continuamente dalla formazione del bocciolo florale fino alla maturazione del frutto. All'antesi il pedicello è lungo circa 1-3 mm, ma alla maturazione della capsula può variare in lunghezza da 15 a 46 mm circa, a secondo della specie. Per la descrizione della specie sono considerate le dimensioni alla maturazione. Goodspeed (1954) considera la corolla formata dal "lembo" e da una "parte tubulare". Quest'ultima viene distinta a sua volta in "tubo propriamente detto", "gola cilindrica" e "gola a coppa". In molte *Nicotianae* australiane la "gola a coppa" si distingue difficilmente dalla "gola cilindrica" e in molte la gola cilindrica è fusa direttamente con il "tubo propriamente detto" (quella parte del tubo sotto l'inserzione dello stame situato più in basso) e non può essere distinto da esso (Figura 14).

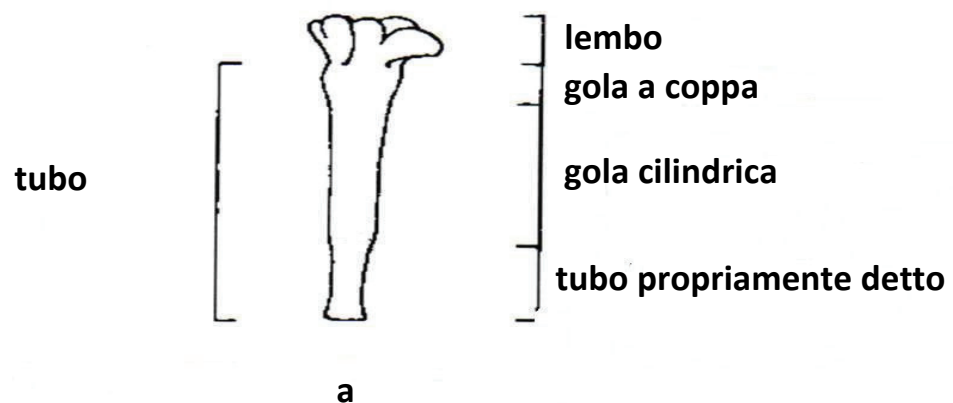


Figura 14. (a) Terminologia delle parti della corolla (Horton, 1981).

Il lembo della corolla è costituito da 5 lobi. I loro margini possono essere acuti, ottusi o emarginati.

La forma delle capsule delle *Nicotianae* australiane varia da ovoidale allargata ad ellissoidale allungata, ma generalmente non è utile ai fini distintivi. Esse sono deiscenti, lungo due piani perpendicolari.

Il tegumento del seme delle specie è ampiamente ornamentato con sporgenze appuntite o arrotondate formando strutture a nido d'ape o crestate. La forma del seme varia da oblungho, curvato e a forma di C. Generalmente i semi maturi presentano piccole variazioni nella forma e nell'ornamentazione all'interno di una specie o di una sottospecie, pertanto tali caratteri sono di valore diagnostico.

Tutte le specie contengono uno o più alcaloidi di tipo piridinico (Willaman 1961, McBarran, 1976). Le foglie fresche o essiccate di diverse specie di *Nicotianae* australiane vengono utilizzate dagli aborigeni come tabacco da masticare, dopo averle spremute e mescolate con cenere, e arrotolate in una cicca.

1.5.1 Distribuzione e relazione intraspecifica tra le specie della sezione *Suaveolentes*

Le specie di *Nicotiana* che sono appartenenti alla sezione *Suaveolentes*, si trovano in alcune isole del Pacifico meridionale, la maggior parte di queste sono limitate all'Australia; la *N. debneyi* si trova anche in Nuova Caledonia e nell'isola di Lord Howe, mentre la *N. fragrans* si trova in alcune isole del Pacifico meridionale (isola dei Pini vicino alla Nuova Caledonia e in poche località site ad est delle isole Marchesi) (Figura 15). Fa eccezione la *N. africana* Merxm., sola specie del genere presente in Africa occidentale scoperta in Namibia nel 1975 (Chase et al., 2003).

Tutte le specie della sezione sono allopoliploidi e hanno numero cromosomico $n=16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24$.

Goodspeed ipotizzò che le specie del genere *Nicotiana* raggiunsero l'Australia attraverso la rotta Antartica e che la *N. suaveolens* ($n=16$) e la *N. debneyi* ($n=24$), specie la cui distribuzione geografica è limitata nelle zone orientali e sud orientali dell'Australia, rappresentano la forma moderna delle originali specie migratorie cioè degli antichi progenitori. Nelle figure 16, 17, 18, 19, 20, 21 è riportata la distribuzione geografica delle specie australiane con indicazione del numero cromosomico.

Le altre specie si ritiene si siano originate in seguito ad eventi di ibridizzazione e di introgressione. La maggior parte delle specie australiane ha numero cromosomico di $n=20$ e sono anche le più diffuse nel continente.

Tre di queste specie, la *N. rosulata* subsp. *rosulata*, la *N. rosulata* subsp. *ingulba* e la *N. goodspeedii* (Figura 16), mostrano strette relazioni morfologiche con la *N. suaveolens*. Le altre due specie con $n=20$, la *N. megalosiphon* e la *N. simulans* (Figura 17), sono meno affini morfologicamente sia alla *N. suaveolens* sia alla *N. debneyi*, ma la *N. simulans* è morfologicamente intermedia tra la *N. megalosiphon* e la *N. occidentalis* subsp. *obliqua* ($n=21$). La *N. rotundifolia* è l'unica specie riconosciuta avente numero di cromosomi $n=22$ ed è morfologicamente simile alla *N. velutina* e alla *N. maritima* entrambe con numero cromosomico ($n=16$) (Figura 18). La *N. occidentalis* subsp. *obliqua* ($n=21$),

la *N. occidentalis* subsp. *occidentalis* (n=21), la *N. occidentalis* subsp. *hesperis* (n=21) (Figura 19), la *N. benthamiana* (n=19), la *N. cavicola* e la *N. umbratica* (n=23) (Figura 20) rivelano affinità con la *N. debneyi* per la presenza di specifici tricomi ghiandolari sull'epidermide. La *N. exigua* (n=16) è simile alla *N. goodspeedii* (n=20). La *N. gossei* e la *N. amplexicaulis* (n=18) hanno distribuzione limitata. La prima mostra alcune affinità con la *N. megalosiphon* e con la *N. occidentalis*, sebbene siano assenti specifici tricomi ghiandolari. La *N. amplexicaulis* sembra posizionata tra la *N. gossei* e la *N. debneyi* (Figura 21), in quanto ha il portamento della prima e la forma del fiore della seconda. La *N. excelsior* (n=19) come la *N. ingulba* è l'unica situata in Australia centrale. Essa mostra caratteri collegati con la *N. suaveolens*, ma la forma affusolata del fiore suggerisce un'affinità con la *N. megalosiphon*.

La *Nicotiana africana* è la sola specie del genere conosciuta in Africa (Mexmullër and Buttler, 1975), scoperta in zone montane isolate della Namibia centrale (Sud-ovest dell'Africa). La sua posizione tassonomica non è del tutto chiara, ma la specie potrebbe essere collocata nel subgenere *Petunioides*, sebbene alcune caratteristiche ricordino chiaramente il subgenere *Rustica* e *Tabacum*. Mexmullër e Buttler affermarono che "probabilmente può essere considerata come una specie relitta di considerevole età tipica della Namibia". La *Nicotiana africana* potrebbe essere considerata un ramo parallelo al gruppo delle altre specie della sezione *Suaveolentes*, tipiche dell'Australia e del Sud Pacifico, con le quali condivide l'essere anfidiplioide ($2n=46$) (Burns, 1982). Fino alla scoperta della *Nicotiana africana* si riteneva che la naturale distribuzione del genere *Nicotiana* fosse limitata al continente americano, al continente australiano e ad alcune isole del Sud Pacifico e la sua scoperta generò un considerevole interesse sull'esistenza di questa specie geograficamente isolata. Nonostante gli accurati studi morfologici di Mexmullër e Buttler (1975) le affinità tassonomiche della *N. africana* non sono del tutto chiare. Anche i tempi e i modi della dispersione verso l'Africa degli antenati della *N. africana* non sono chiari, tenuto conto della precoce separazione di questo continente dal resto del supercontinente Gondwana. Questo

evento è solitamente attribuito al primo Cretaceo (Raven et al., 1974; Shuster, 1976).

Secondo Goodspeed (1954) il genere *Nicotiana* si è differenziato nel Sud America nella metà o nel tardo Terziario e soltanto in un'era successiva potrebbe essersi diffuso verso l'Australia attraverso un ponte costituito da territori Antartici. Numerose indagini biochimiche suggeriscono molte affinità tra la *N. africana* e le altre *Suaveolentes*. La *N. africana* condivide con alcune specie di questo gruppo, incluso la *N. fragrans* e la *N. debneyi*, l'insensibilità alla tentoxina (Burk et al., 1978), una caratteristica che viene ereditata per via citoplasmatica. L'insensibilità alla tentoxina esiste però anche in diverse specie del Sud America come la *N. noctiflora*. Altro carattere biochimico della *N. africana* in comune con le *Suaveolentes* è relativo alle sequenze polipeptidiche delle subunità maggiori della ribulosio-bifosfato carbossilasi, che sono in gran parte presenti in specie dell'Australia e del Sud Pacifico (Chen et al., 1976). Al di fuori della suddetta sezione, subunità con la stessa sequenza si trovano solo nella *N. petunioides* e nella *N. noctiflora*, specie del Sud-America, considerate ancestrali di quelle australiane (Gerstel et al., 1979).

Inoltre, altra caratteristica che accomuna la *N. africana* al resto delle specie della sezione è rappresentata dalla resistenza alla *Erisiphe cichoracearum* agente patogeno dell'oidio, presente nella quasi totalità delle specie della sezione *Suaveolentes*.

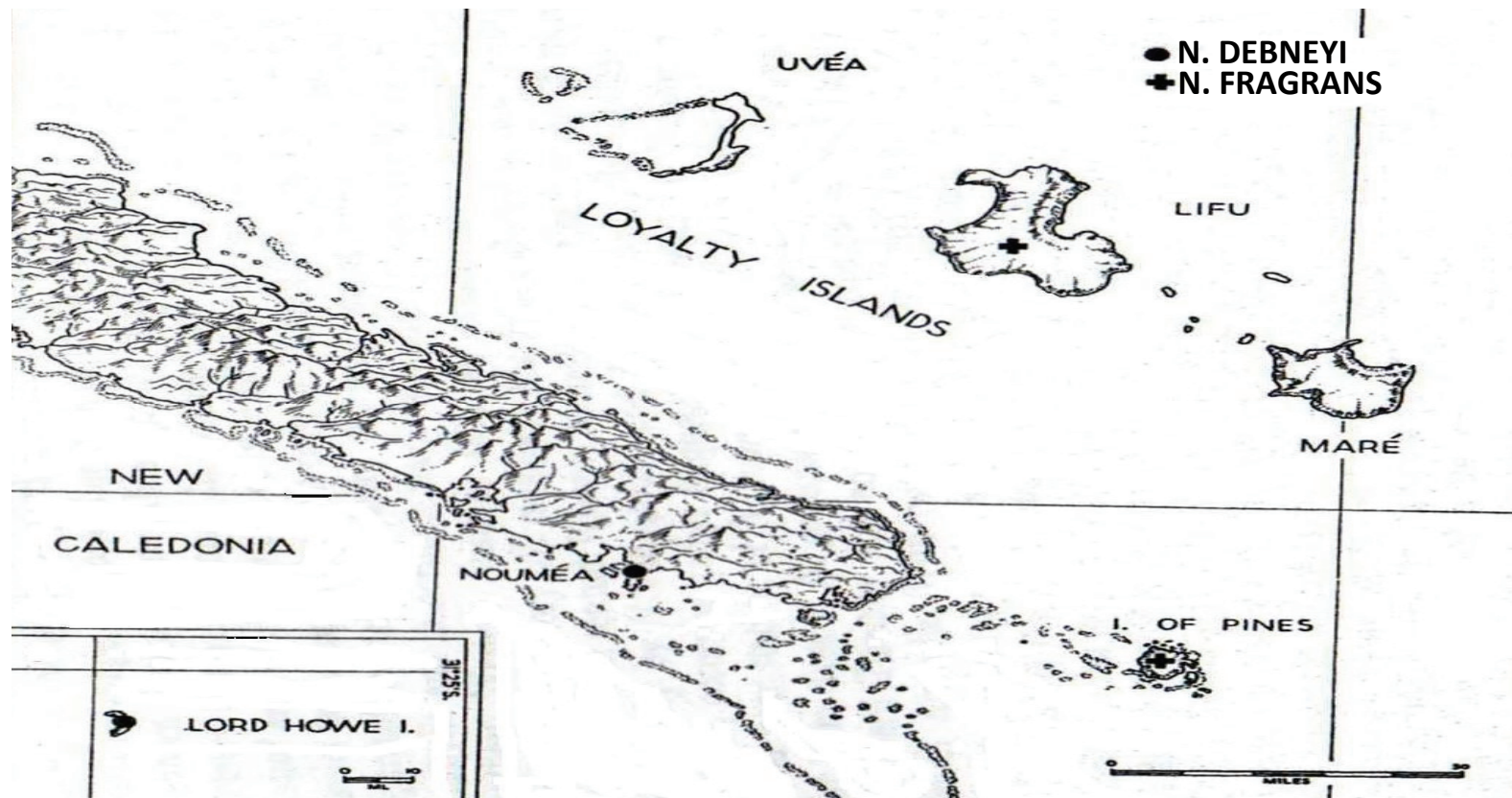


Figura (15). Distribuzione geografica delle specie australiane del genere *Nicotiana* (Goodspeed, 1954).

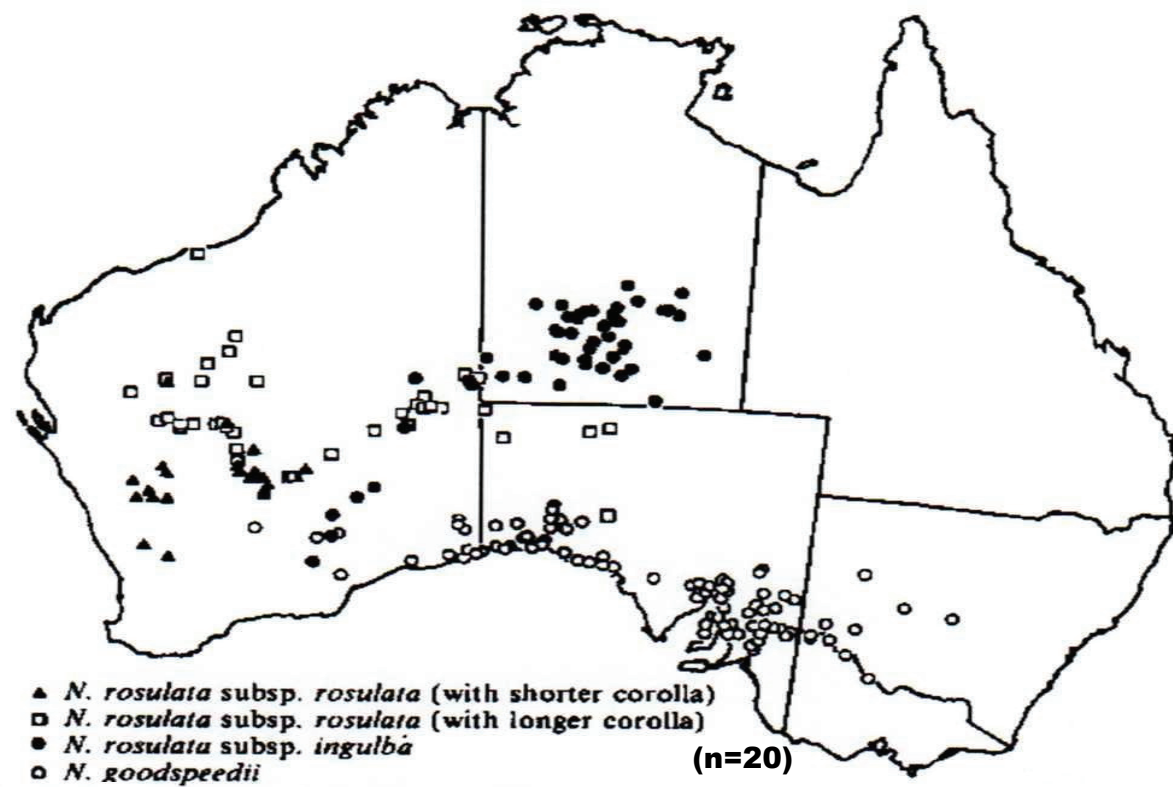


Figura (16). Distribuzione geografica delle specie australiane del genere *Nicotiana* e indicazione del numero cromosomico (n) delle specie (Horton, 1981).

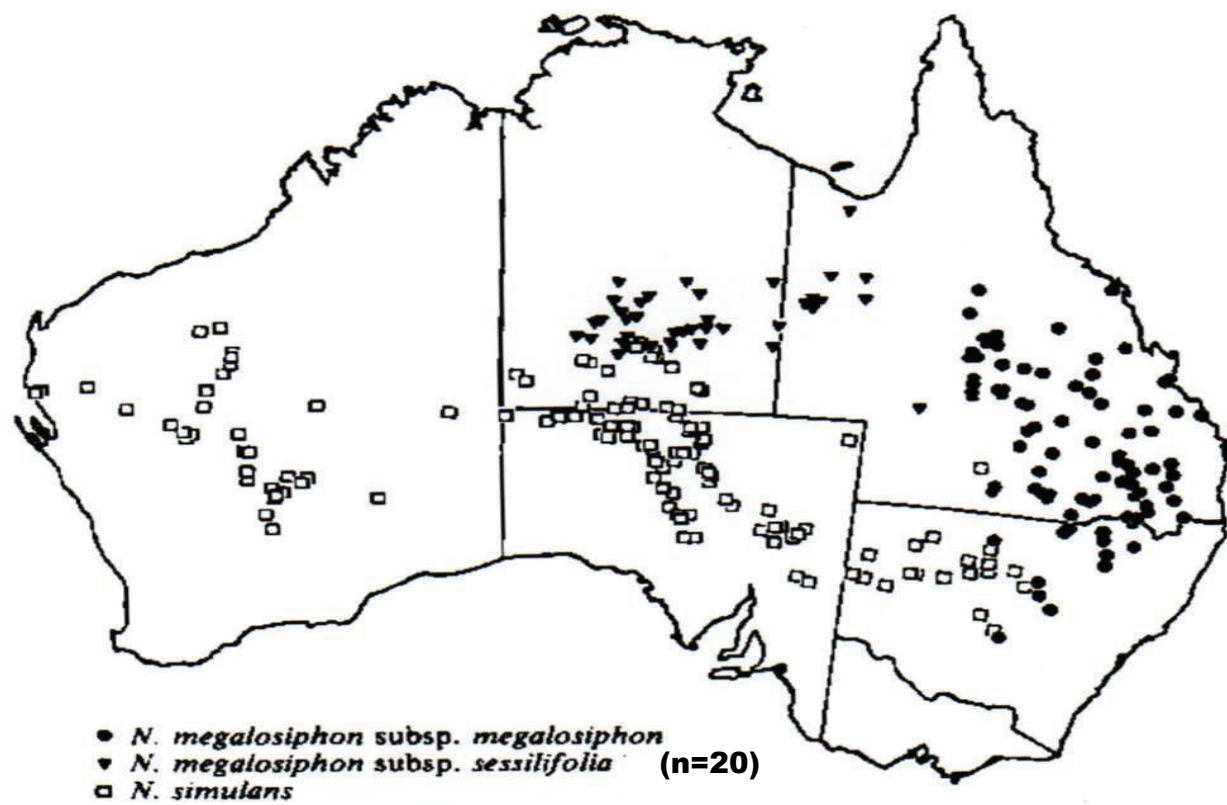


Figura (17). Distribuzione geografica delle specie australiane del genere *Nicotiana* e indicazione del numero cromosomico (n) delle specie (Horton, 1981).

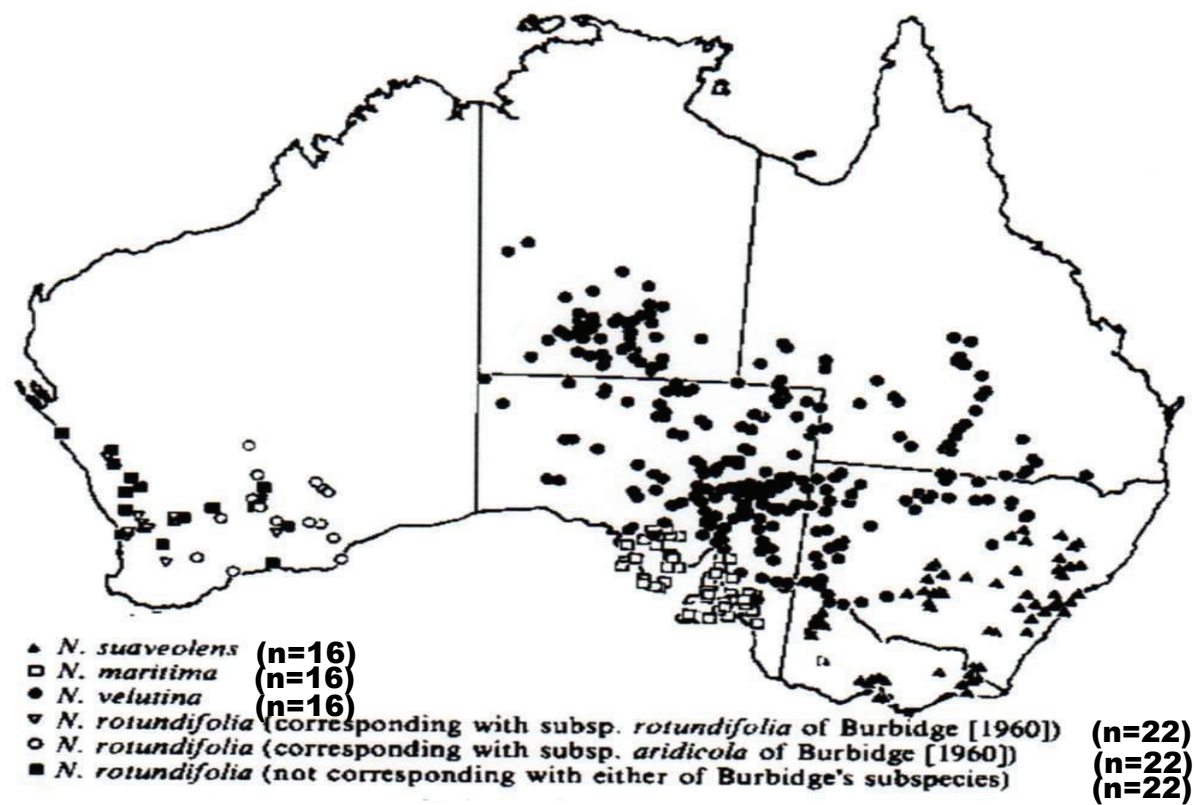


Figura (18). Distribuzione geografica delle specie australiane del genere *Nicotiana* e indicazione del numero cromosomico (n) delle specie (Horton,1981).

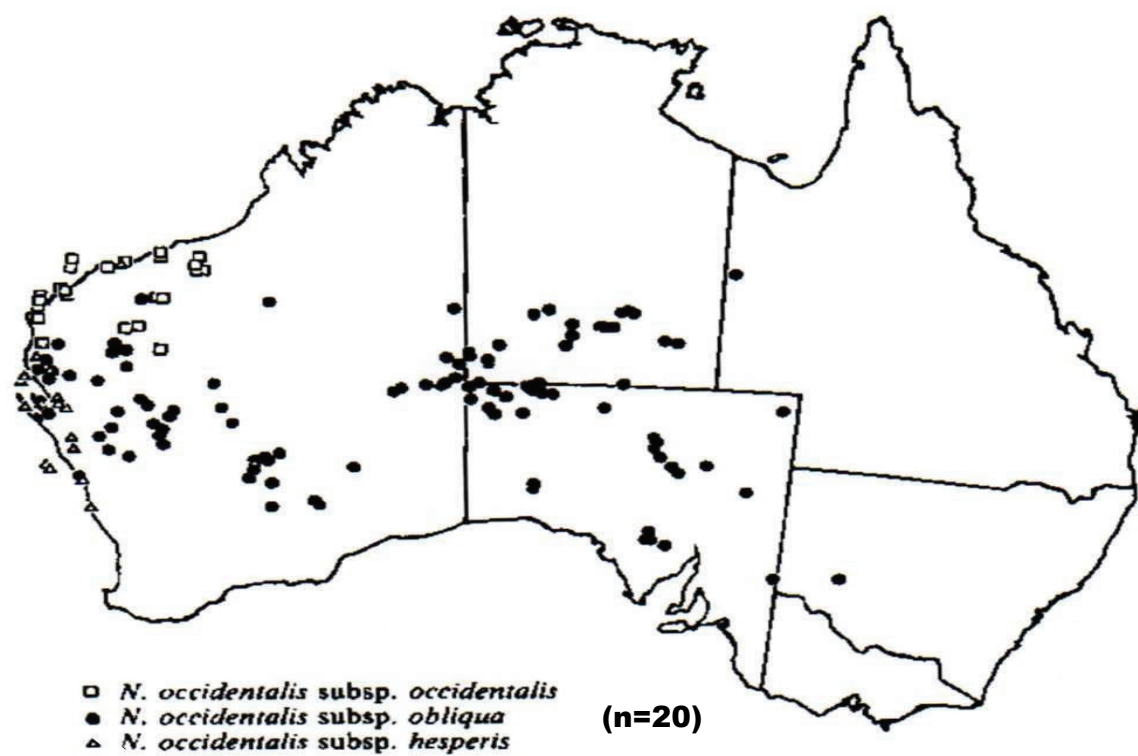


Figura (19). Distribuzione geografica delle specie australiane del genere *Nicotiana* e indicazione del numero cromosomico (n) delle specie (Horton, 1981).

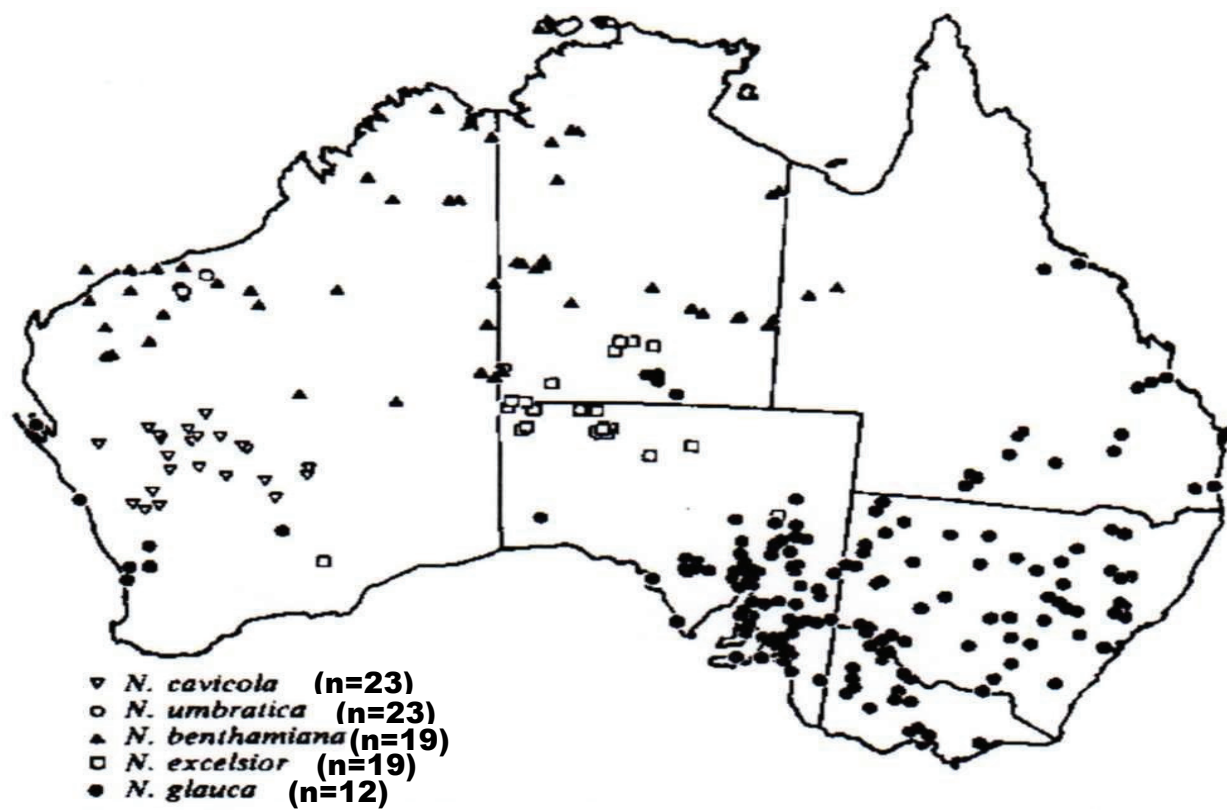


Figura (20). Distribuzione geografica delle specie australiane del genere *Nicotiana* e indicazione del numero cromosomico (n) delle specie (Horton, 1981).

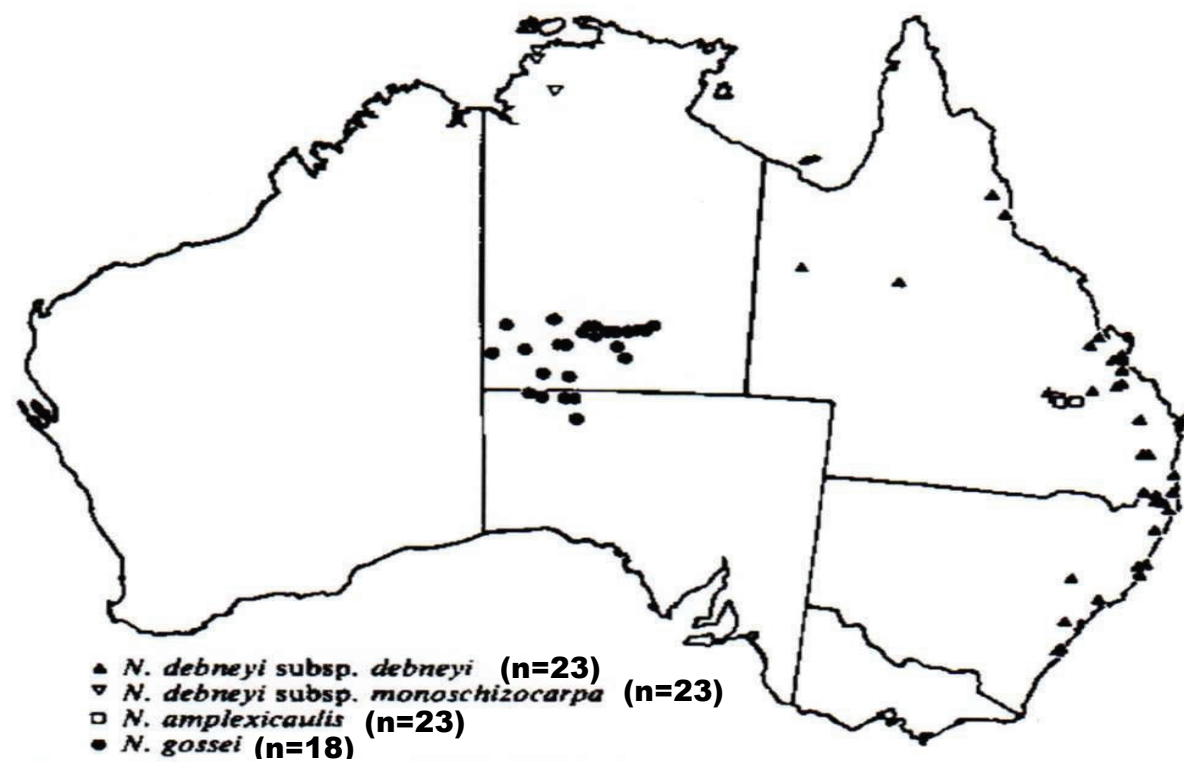


Figura (21). Distribuzione geografica delle specie australiane del genere *Nicotiana* e indicazione del numero cromosomico (n) delle specie (Horton, 1981).

1.6 *Nicotiana wuttkei*

Nel nuovo schema tassonomico proposto da Knapp, alcune specie sono state assegnate alle diverse sezioni solo in base alle caratteristiche morfologiche. Tra quest'ultime possiamo citare la *Nicotiana wuttkei* scoperta nel Nord-Est del Queensland (Australia), dal dottore Herb Wuttke, e descritta per la prima volta nel 1991 da Clarkson & Symon, come specie appartenente alla sezione *Suaveolentes*. Tali autori la descrivono come una pianta erbacea annuale, con uno o pochi steli dal livello del suolo. Le foglie sono radicali e cauline, picciolate; l'apice si presenta da acuto ad acuminato; e la base da cuneata ad attenuata; il picciolo è alato di lunghezza variabile da 2 a 5 cm.

Il rivestimento dell'epidermide sulle brattee, sui pedicelli e sul calice consiste di tricomi multicellulari con testa di forma globulare e piccoli idatodi unicellulari con testa di forma globulare. Il resto della pianta è pubescente con tricomi multicellulari privi di ghiandole.

L'infiorescenza è a pannocchia con fiori di colore bianco; le brattee hanno forma variabile da lineari a lineari-lanceolate, lunghe da 2 a 5 cm; il pedicello è lungo da 12 a 15 mm nel frutto maturo. Il calice è pentagamosepalo di circa 7-10 mm di lunghezza. Il tubo corollinico è lungo 16-18 mm e largo circa 3 mm; la corolla è pentagamopetala con lembo di circa 9 mm di diametro; i lobi emarginati fusi per circa 1/3-1/2 della loro lunghezza. I 4 stami che arrivano a livello della gola del tubo corollinico sono inclusi con la parte libera del filamento lunga solo 1-1,5 mm; il quinto stame, si trova 2,5 mm al di sotto dei quattro stami superiori, la porzione libera del filamento lunga circa 10 mm. La capsula è ovata e lunga 8-9 mm. I semi sono reniformi aventi dimensioni di circa 0,8-0,9 mm, con superficie ornata di creste serpentine.

La pianta è situata ai margini di foreste isolate in suoli derivati da basalto. Clarkson & Symon riportano per la *N. wuttkei* un numero di cromosomi $n=14$, atipico per la sezione e per il genere, e somiglianze morfologiche con la *N. suaveolens* pur presentando fiori con tubo corollinico di lunghezza molto minore. Osservazioni contrastanti sono state riportate da Laskowski and Berbeć (2003), secondo i quali invece la *Nicotiana wuttkei*

ha un numero di cromosomi $n=16$, un portamento più strettamente correlato a quello della *N. maritima* e l'infiorescenza e le dimensioni del fiore simili alla *N. amplexicaulis*.

1.7 Marcatori molecolari

Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico, rilevabile con sonde (probe) o inneschi (primer) specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3'.

I marcatori molecolari, si basano direttamente sulla rilevazione di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA che costituisce il genoma di ogni individuo (dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc.) e non sono generalmente riferibili all'attività di specifici geni. I marcatori molecolari presentano diversi aspetti positivi:

- coprono qualsiasi parte del genoma (trascritta e non, quindi anche introni e regioni di regolazione), permettendo così di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili;
- non subiscono interferenze da parte dell'ambiente, trattandosi di differenze a livello della molecola del DNA;
- in molti casi hanno espressione codominante, consentendo così di distinguere l'eterozigote dagli omozigoti.

In base alla tecnica molecolare utilizzata si distinguono due gruppi: a) marcatori molecolari ottenuti per ibridazione, come quelli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) che evidenziano polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (Beckmann and Soller, 1983); b) marcatori ottenuti dopo amplificazione di una sequenza di DNA con la reazione a catena della polimerasi (PCR) (Mullis and Faloona, 1987).

Il polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) è la conseguenza delle variazioni che esistono nella distribuzione e presenza (o assenza) di siti di restrizione riconosciuti da una endonucleasi. Le endonucleasi di restrizione riconoscono piccole sequenze (3-9 basi) di DNA e tagliano in un punto fisso di esse. La variazione di una singola base nella sequenza è sufficiente affinché l'enzima non riconosca il sito e di conseguenza non ci sia alcun taglio. Il polimorfismo viene così generato

quando si verifica perdita o creazione di un sito di restrizione oppure a variazioni nella lunghezza dei frammenti di restrizione dovuto a inserzione e delezione di basi od ancora a variazione della sequenza nucleotidica nella regione di ibridazione della sonda. Il polimorfismo viene evidenziato con sonde marcate, con fosforo radioattivo (^{32}P) oppure con sostanze coloranti o fluorescenti al fine di evidenziare solo quei frammenti di restrizione aventi sequenze complementari a quelle delle sonde utilizzate. Le sequenze genomiche esplorate sono in singola copia o a basso numero di copie. I marcatori RFLP sono codominanti. I vantaggi di questa tecnica risiedono nella riproducibilità dei risultati.

Un altro tipo di marcatore che prevede l'utilizzo combinato delle tecniche di restrizione e di ibridazione è quello denominato VNTR (Variable Number of Tandem Repeat). Il polimorfismo descritto da questi marcatori è generato dalla variazione nel numero di elementi, costituiti da complesse sequenze ripetute costituite da 10 a 60 bp, chiamate minisatelliti, comprese fra due siti riconosciuti da enzimi di restrizione (Barcaccia et al., 2000). Le sonde di ibridazione utilizzate sono costituite da sequenze di elementi ripetuti.

I marcatori basati sulla tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) sono ottenuti mediante un'amplificazione specifica di sequenze di DNA, usando primer oligonucleotidici sintetici complementari a tratti presenti ad idonee distanze sugli opposti filamenti del DNA genomico in esame, ad opera di una DNA polimerasi termostabile. Il processo di PCR è ciclico e ciascun ciclo consiste di tre fasi: 1) denaturazione termica del DNA; 2) ibridazione degli inneschi (primer) nei siti del DNA stampo aventi sequenze complementari; 3) sintesi di un nuovo filamento di DNA, complementare a quello stampo a partire dagli inneschi ad opera della DNA polimerasi in presenza dei deossiribonucleotidi (dNTPs). La quantità di DNA, che funge da stampo è piccola (25-50 ng) e i filamenti di nuova sintesi fungono a loro volta da stampo per i cicli successivi; quindi alla fine di ogni serie di reazione viene duplicato l'ammontare di DNA sintetizzato. Il numero dei cicli può variare da 25 a 45.

Nei primi esperimenti di sintesi in vitro del DNA fu utilizzata come DNA polimerasi il frammento Klenow della DNA polimerasi di *Escherichia coli*, la quale doveva essere aggiunta dopo ogni step di denaturazione perché termolabile (Saiki et al., 1985). La scoperta di batteri termofili e l'isolamento della loro DNA polimerasi ha determinato il successo di questa tecnica. I marcatori che si basano sulla reazione a catena della polimerasi sono oggi in piena evoluzione. Tra i più comunemente utilizzati possiamo citare quelli ottenuti con la tecnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et al., 1995), SSRs (Simple Sequence Repeats) (Tautz, 1989) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Zietkiewicz et al., 1994).

I marcatori RAPD sono ottenuti mediante amplificazione di frammenti di DNA utilizzando come primer corti oligonucleotidi (10 nucleotidi) a sequenza arbitraria con un contenuto di C+G superiore al 60%. Il prodotto dell'amplificazione, quindi, è un tratto cromosomico la cui sequenza non è nota, racchiuso tra due sequenze complementari al primer. I polimorfismi evidenziati sono dovuti a differenze nelle sequenze nucleotidiche riconosciute dai primer oppure nella dimensione del frammento compreso tra i siti di attacco degli stessi. Lo svantaggio dei marcatori RAPD è di essere dominanti; inoltre possono dare problemi di riproducibilità, in quanto le condizioni di amplificazione presentano una "stringenza" molto bassa, data dalla natura del primer. Di contro vi è la possibilità di saggiare più loci genici contemporaneamente e sono molto utili per lo studio della variabilità genetica delle popolazioni naturali e sperimentali.

La tecnica denominata AFLP, si basa sull'amplificazione selettiva mediante PCR di frammenti di DNA derivati dalla digestione del DNA genomico con specifici enzimi di restrizione (Vos et al., 1995). L'origine del polimorfismo generato con questa metodica è molteplice visto che può essere dovuto a delezione o all'inserzione di basi che possono creare o far perdere siti di restrizione, ma anche a cambiamenti della sequenza interna dove agiscono le basi discriminanti di uno o entrambi i primer oppure alla lunghezza totale del frammento ristretto amplificato. Come gli

RFLP, gli AFLP sono altamente riproducibili e come i marcatori RAPD, non richiedono conoscenze a priori della sequenza del DNA, tuttavia sono marcatori dominanti e richiedono una procedura operativa tecnicamente complessa e costosa.

La tecnica SSR si basa sull'amplificazione di zone del DNA contenenti semplici sequenze ripetute di oligonucleotidi di 2-5 coppie di basi tipo $(CA)_n$, $(GATA)_n$, $(GCC)_n$ denominate microsatelliti, disperse nel genoma (Barcaccia et al., 2000). Le sequenze più abbondanti riscontrate nel genoma vegetale sono del tipo $(A)_n$, $(AG)_n$, $(AAT)_n$, $(AAC)_n$, $(AGC)_n$, $(AAG)_n$, $(AATT)_n$, $(AAAT)_n$ e $(AC)_n$ (Gupta & Owen, 1994). Con questa metodica viene amplificata una porzione di DNA genomico contenente al suo interno un microsatellite, utilizzando inneschi oligonucleotidici con sequenza disegnata previa conoscenza della regione di DNA fiancheggiante il microsatellite. Mutazioni occasionali del tratto microsatellitare sono attribuibili allo scivolamento reciproco dei due filamenti di DNA durante la replicazione e ad errori del sistema di riparazione delle basi del DNA. Tale classe di marcatori molecolari consente di mettere in evidenza un'elevatissima diversità genetica poiché i polimorfismi sono dovuti a variazioni alleliche allo stesso locus. Tale caratteristica li rende particolarmente adatti alla tipizzazione genotipica e all'identificazione varietale. Il maggiore vantaggio dei marcatori SSR risiede comunque nell'elevata riproducibilità dei polimorfismi analogamente ai marcatori RFLP. Grazie alla loro ubiquità, ipervariabilità, abbondanza ed ampia distribuzione nel genoma, i loci SSR rappresentano un tipo di marcatore genetico utile per gli organismi eucarioti sia animale che vegetali (Gupta & Vershney, 2000). L'utilizzo di questo sistema di marcatori molecolari è però limitato dalla necessità di conoscere la sequenza di basi del DNA delle regioni fiancheggianti, al fine di designare i primer specifici per l'amplificazione PCR.

Un'altra tecnica basata sull'abbondanza delle sequenze microsatellite nel genoma degli eucarioti è denominata marcatori ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Zietkiewicz et al., 1994) (Figura 22).

ogni locus si può evidenziare la presenza/assenza della banda, ma non è possibile distinguere la situazione eterozigote da quella omozigote. I marcatori ISSR sono in grado di evidenziare polimorfismi dovuti alla presenza di inserzioni/delezioni all'interno delle zone comprese tra i siti complementari al primer, oppure alla presenza di mutazioni a livello delle basi complementari ai nucleotidi di ancoraggio del primer. I polimorfismi osservati possono dipendere anche dalla variazione del numero di ripetizioni presenti nei loci microsatelliti evidenziabili solo nel caso di utilizzo di primer ancorati in 5'. Inoltre la frequenza e la distribuzione di motivi microsatellitari ripetuti dipendenti dalla specie in esame, influenzano la generazione dei prodotti di amplificazione (Reddy et al., 2000). I marcatori molecolari ISSR si sono rivelati un utile strumento per stimare l'estensione della diversità genetica inter- ed intra-specifica in un'ampia varietà di specie vegetali (Godwin et al., 1997; Reddy et al., 2002, Tikunov et al., 2003). Ad esempio sono stati usati con successo in specie agricole, come il pomodoro (Tikunov et al., 2003), la patata (Bornet et al., 2002), il fagiolo (Galván et al., 2003), il frumento (Nagaoka & Ogihara, 1997). Sono stati utilizzati altresì per risolvere problemi di ibridazione, di introgressione e di speciazione di ibridi diploidi anche in popolazioni naturali e in indagini filogeografiche, dove l'analisi filogenetica è messa in relazione alle informazioni geografiche ed ecologiche.

Gli ISSR devono comunque essere usati con cautela in studi sistematici, poiché l'alto livello di polimorfismi potrebbe anche introdurre un alto livello di omeoplasie in alcune specie geneticamente divergenti.

PROGETTO

L'attività di ricerca del presente lavoro ha riguardato una specie di *Nicotiana*, recentemente scoperta, la *N. wuttkei* Clarkson & Symon, sulla quale, esistono in letteratura pochissime e peraltro discordanti notizie, sia sulla morfologia che sul numero di cromosomi (Clarkson & Symon, 1991; Laskowska & Berbeć, 2003).

Clarkson & Symon riportano per la *N. wuttkei* un numero di cromosomi $n=14$, atipico per la sezione e per il genere, e somiglianze morfologiche con la *N. suaveolens* anche se i fiori presentano un tubo corollinico di lunghezza molto minore. Osservazioni contrastanti sono state riportate da Laskowska & Berbeć (2003) secondo i quali la *Nicotiana wuttkei* ha un numero di cromosomi $n=16$, un portamento più strettamente correlato a quello della *N. maritima* e l'infiorescenza e le dimensioni del fiore simili alla *N. amplexicaulis*.

Essendo scarse e dubbie le informazioni relative alla morfologia, al numero dei cromosomi e alle relazioni genetiche tra la *N. wuttkei* e le altre specie della sezione *Suaveolentes* è stato intrapreso uno studio, basato sull'impiego di marcatori molecolari, al fine di contribuire alla caratterizzazione di questa nuova specie di *Nicotiana* e ad un suo primo inquadramento sistematico. A tale scopo è stata effettuata un'analisi del polimorfismo generato da marcatori molecolari ISSR (Zietkiewicz et al., 1994) per valutare le relazioni genetiche tra la *N. wuttkei* e le altre specie di *Nicotiana* appartenenti alla sezione delle *Suaveolentes*. Tale classe di marcatori molecolari è stata utilizzata con successo per evidenziare la diversità genetica inter e intra specifica in un'ampia varietà di specie vegetali (Godwin et al., 1997; Reddy et al., 2002). Parallelamente alle indagini molecolari che hanno evidenziato i polimorfismi genetici delle specie esaminate sono state effettuate osservazioni morfologiche ed indagini citologiche per l'individuazione dell'esatto numero cromosomico della specie in esame per una sua giusta collocazione nella sezione *Suaveolentes*.

MATERIALI E METODI

2.1 Allevamento delle piante

Questa ricerca è stata condotta utilizzando specie di *Nicotiana*, disponibili presso la collezione botanica del C.R.A.- Unità di ricerca per le Colture alternative al tabacco di Scafati (SA). Le specie di *Nicotiana* utilizzate per questo studio sono riportate nella Tabella 3. Le piante sono state allevate in vaso, sotto serra, in condizioni di luce naturale fino al completamento del ciclo vegetativo (Foto 1).



Foto 1. Allevamento in serra delle specie australiane della sezione *Suaveolentes*.

Tabella 3. Specie di *Nicotiana* esaminate.

Sezione	Specie	Authority	n
<i>Nicotiana</i>	<i>N. tabacum</i>	Linneo	24
<i>Suaveolentes</i>	<i>N. benthamiana</i>	Domin	19
	<i>N. umbratica</i>	N. T. Burbidge	23
	<i>N. cavicola</i>	N. T. Burbidge	23
	<i>N. debneyi</i>	Domin	24
	<i>N. gossei</i>	Domin	18
	<i>N. amplexicaulis</i>	N.T. Burbidge	18
	<i>N. maritima</i>	H. M. Wheeler	16
	<i>N. velutina</i>	H. M. Wheeler	16
	<i>N. hesperis</i>	N. T. Burbidge	23
	<i>N. occidentalis</i>	H. M. Wheeler	21
	<i>N. simulans</i>	N. T. Burbidge	20
	<i>N. megalosiphon</i>	Van Huerck and Müll.	20
	<i>N. rotundifolia</i>	Lindley	22
	<i>N. excelsior</i>	(J.M. Black) J. M. Black	19
	<i>N. suaveolens</i>	Lehmann	16
	<i>N. ingulba</i>	(J.M. Black) J. M. Black	20
	<i>N. exigua</i>	H. M. Wheeler	16
	<i>N. goodspeedii</i>	H. M. Wheeler	20
	<i>N. rosulata</i>	Domin	20
	<i>N. africana</i>	Merxmüller	23
	<i>N. wuttkei</i>	Clarkson and Symon	14/16

2.2 Analisi citologica dell'apice radicale

Gli esperimenti per la determinazione del numero dei cromosomi sono stati condotti su apici radicali, a livello dei quali vi è un'intensa attività di proliferazione cellulare.

La procedura prevede l'utilizzo di due inibitori del fuso mitotico che hanno la funzione di bloccare la mitosi nello stadio di metafase delle cellule in divisione al fine di poterne contare il numero dei cromosomi. Gli inibitori utilizzati noti in letteratura sono la colchicina (un alcaloide estratto dalle piante del croco "*colchicum autumnale*") e l'8-idrossichinolina (o ossina) che è un derivato della chinolina.

Entrambi si legano ai monomeri della tubulina non permettendo la formazione delle fibre del fuso mitotico.

Le specie utilizzate per questo tipo di analisi, sono state seminate in piastre Petri su di un filtro di carta e fatte germinare in camera climatizzata a temperatura di 18-20°C, con un'illuminazione di 4.000 lux, con fotoperiodo di 16 ore di luce ed 8 ore di buio. Dopo circa due settimane le piantine sono state trasferite in torba, allo scopo di permettere lo sviluppo di un buon apparato radicale. Dopo 20 gg sono stati prelevati dalle piantine frammenti di radici contenenti gli apici radicali (Foto 2). Dopo lavaggio questi sono stati trattati con una soluzione di colchicina (0,05%) e 8-idrossichinolina (0,025%) per 3h e 30' a 18-20°C e quindi fissati nel reattivo di Carnoy (acido acetico glaciale/etanolo assoluto, 1:3) preparato fresco. Il materiale è stato quindi prelevato e immerso in HCl 1N a 60 °C, per 7 minuti. Gli apici sono stati velocemente posti nel reattivo di Schiff (fucsina basica) per 20 minuti e poi lavati con H₂O distillata per eliminare il colorante in eccesso e schiacciati su vetrino in una goccia di Acetocarminio al 2%, coprendo con un coprioggetto. Per poter conservare il vetrino per 2-3 giorni, i bordi del coprioggetto sono stati sigillati con paraffina per impedire la disidratazione del campione. Il campione così preparato viene osservato al microscopio ottico OLYMPUS BX 51 equipaggiato con un sistema di acquisizione e analisi di immagine.



Foto 2. *Nicotiana wuttkei*

2.3 Isolamento di DNA genomico

Per ciascuna specie l'estrazione del DNA è stata effettuata da tessuto fogliare, utilizzando il Kit Nucleon Phytopure (Amersham Bioscience), basato sull'uso di sostanze detergenti in combinazione con una resina particolare che lega i polisaccaridi per l'allontanamento delle sostanze contaminanti. A 100 mg di campione polverizzato in azoto liquido posto in un tubo di polipropilene da 1,5 ml, si aggiungono 600 µl di reagente 1 del Kit, previamente addizionato con 2-mercaptoetanol (0,78 µl/ml) al momento dell'uso, si omogeneizza per effettuare la lisi cellulare. Si aggiunge RNAsi (20 µg/ml) e si incuba a 37°C per 30 minuti. Si aggiungono 200 µl di reagente 2 del Kit, si agita invertendo delicatamente il tubo, si incuba nuovamente a 65°C per 10 minuti. Durante l'incubazione si agita manualmente ogni minuto capovolgendo il tubo. Terminata l'incubazione si pone in ghiaccio per 20 minuti. Quindi si addizionano 500 µl di cloroformio, mantenuto a -20°C, e 100 µl di resina Nucleon. La resina è un gel di silice modificato per la presenza di gruppi liberi di acido borico ($-B(OH)_2$). Tali residui reagiscono con gli 1,2 idrossicomposti formando esteri ciclici. L'impiego di tale resina risulta vantaggioso in quanto lega i polisaccaridi, i quali sono contaminanti particolarmente difficili da allontanare quando si prepara il DNA da tessuto vegetale. Si agita per 10 minuti a temperatura ambiente e si centrifuga a 1300g per 10 minuti. Si ottengono così 2 fasi, separate da un'interfaccia semisolida. A questo punto si trasferisce la fase acquosa contenente il DNA in una microprovetta e si addiziona un ugual volume di isopropanolo freddo per precipitare il DNA. Successivamente si centrifuga a 4000g per 5 minuti affinché il precipitato si compatti; si elimina l'isopropanolo e si lava il pellet con etanolo al 70%. Si centrifuga a 4000g per 5 minuti e infine, eliminato l'etanolo, si asciuga il pellet sotto vuoto, si solubilizza il pellet in tampone TE (pH 8.0). I campioni vengono conservati a -20 °C.

2.4 Determinazione della concentrazione di DNA

La concentrazione del DNA è stata stimata mediante metodo fluorimetrico utilizzando il DyNA Quant TM 200 Fluometer (Hoefer). Il metodo si basa sulla capacità che ha il composto Bisbenzimide (colorante Hoechst 33258) di legarsi al DNA, in particolare al solco minore dell'elica. Lo spettro di emissione del colorante in assenza del DNA presenta un picco di eccitazione a 356 nm e di emissione a 492 nm; in presenza di DNA il picco di eccitazione si sposta a 365 nm mentre quello di emissione a 458 nm; la fluorescenza misurata a questa lunghezza d'onda è proporzionale alla concentrazione di DNA. E' da tenere presente che la stima è influenzata dal contenuto di A-T presente nel campione, quindi risulta necessario l'utilizzo di uno standard la cui composizione in basi sia simile al campione in esame. A questo scopo è stato utilizzato DNA di timo di vitello che risulta essere soddisfacente come riferimento per molti DNA vegetali ed animali. Questa metodica consente una stima accurata di DNA anche in presenza di RNA se le condizioni di salinità non sono elevate; i valori ottimali si ottengono con valori inferiori all'1%. La determinazione del DNA al fluorimetro è stata effettuata utilizzando il tampone TNE 10X pH 7,4 costituito da 100 mM di Tris [Tris-(idrossimetil) amino metano], 10mM EDTA, (Etilendiaminotetraacetato sale sodico) e 2M di NaCl per la preparazione della soluzione di saggio (Hoechst 33258 stock solution [0,1µg/ml] in TNE 1X sterile) e dello standard (Calf Thymus DNA [100 µg/ml] in TNE 1X sterile).

2.5 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio

Il principio dell'elettroforesi si basa sulla capacità delle macromolecole di muoversi in una matrice polimerica in presenza di un campo elettrico. La direzione del movimento dipende dal segno e dalla grandezza della carica posseduta e da forma e dimensione della particella. La velocità di migrazione viene influenzata indirettamente dalla massa molecolare. Gli acidi nucleici sono carichi negativamente e migrano così dal catodo all'anodo. Il controllo della temperatura durante l'elettroforesi è importante in quanto il valore di quest'ultima è in diretta relazione con lo stato conformazionale delle molecole migranti. Per la preparazione del gel l'agarosio (Molecular Biology Agarose Bio-Rad) è stato sciolto in tampone TAE 1X pH 8.0 (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) e riscaldato evitando l'ebollizione per facilitarne il completo scioglimento. Dopo raffreddamento a circa 50 °C è stato aggiunto bromuro di etidio (Sigma) alla concentrazione finale di 1 µg/ml. La soluzione così preparata è stata versata in una vaschetta stampo alla quale precedentemente è stato posto un pettine per la formazione dei pozzetti. A ciascuno dei campioni da sottoporre ad elettroforesi è stata aggiunta una soluzione colorante ad alta densità allo scopo di facilitarne il caricamento nel pozzetto e di seguire la corsa elettroforetica. La soluzione utilizzata è costituita da: 0,05% blu di bromofenolo, 40% di saccarosio, 0,1 M EDTA pH 8 e 0,5% di SDS (sodio dodecil solfato). L'elettroforesi è stata eseguita a voltaggio costante applicando una differenza di potenziale di 5 Volt/cm per la durata di 60-90 minuti. Dopo l'elettroforesi il DNA genomico ottenuto è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio (0,8%). Insieme ai campioni è stato caricato un DNA di riferimento (λ DNA 250 ng). Al termine della corsa il DNA è stato visualizzato mediante luce UV e l'immagine è stata acquisita mediante il sistema GEL DOC 2000 e analizzato utilizzando il programma di elaborazione, Multi-Analyst (Bio-Rad).

2.6 Reazione di amplificazione ISSR

Le reazioni di amplificazione sono state condotte utilizzando 20 ng di DNA e 20 pmol (0,8 μ M) di primer in un volume di 25 μ l della seguente soluzione: 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 200 μ M di ciascun deossinucleoside trifosfato (dATP, dGTP dCTP e dTTP) e 0,04 U/ μ l di Taq polymerase (AmpliTaq Gold - Applera Italia). Tutte le operazioni relative alla preparazione delle miscele di reazione di amplificazione sono state condotte in condizioni di sterilità, operando con guanti senza talco sotto una cappa a flusso laminare orizzontale e utilizzando materiale sterile (tubi di polipropilene da 1,5 ml e i microtubi da 0,5 ml).

I primer utilizzati sono stati forniti dalla MWG Biotech Spa e dalla Primm. I controlli negativi sono stati effettuati aggiungendo acqua sterile in sostituzione del DNA. I tubi sono stati agitati delicatamente e sottoposti a rapida centrifugata al fine di non lasciare goccioline di soluzione sulla pareti del microtubo. La reazione di amplificazione è stata condotta nel termocicizzatore Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems).

Il ciclo termico utilizzato per i primer P15 [GGT(CA)₇C] e 8565 [GT(CAC)₇], è stato il seguente: denaturazione iniziale a 95°C per 3 minuti, seguita da 2 cicli di 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 63°C e 2 minuti a 72°C, quindi si riduce la temperatura di ibridazione di 1°C ogni due cicli fino alla temperatura di 58°C; l'ultimo ciclo è ripetuto per 26 volte, terminando con un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Il ciclo termico utilizzato per i primer L2 [(AG)₈YA], UBC840C [(GA)₈CT], UBC826 [(AC)₈C], UBC844 [(CT)₈RC], UBC855 [(AC)₈YT], UBC845 [(CT)₈RG], L7 [DD(CCA)₅], P1 [(CA)₈AAG], P7 [(CA)₈GG], P834 [(AG)₈CTT], è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti, seguita da 45 cicli di 45 secondi a 94°C, 45 secondi a 52 °C e 90 secondi a 72°C, terminando con un'estensione finale a 72°C per 7 minuti. I frammenti ottenuti dall'amplificazione sono sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio (1,8%); l'agarosio si comporta da setaccio molecolare ed è capace di ritardare frammenti a più alto peso molecolare, facilitando la migrazione di quelli a più basso peso molecolare. Le corse elettroforetiche

sono state eseguite in celle orizzontali in tampone TAE 1X, contenente bromuro di etidio alla concentrazione finale di (1µg/ml), concentrazione pari a quella presente nel gel, ad un voltaggio costante di 5V/cm. Per la stima del peso molecolare dei frammenti è stato utilizzato il marcatore MMVI (Boheringher).

2.7 Analisi dei dati molecolari

L'analisi dei profili di amplificazione è stata eseguita, dopo acquisizione del gel con il sistema GEL DOC 2000, utilizzando il programma Multi-Analyst (Bio-Rad). Dall'analisi dei pattern elettroforetici è stato determinato il numero delle bande totali e di quelle polimorfiche. I dati di presenza e assenza delle bande hanno consentito di costruire una matrice binaria (0-1). Utilizzando il coefficiente di Jaccard secondo la formula $n_{ab}/(n_a+n_b-n_{ab})$, dove n_{ab} rappresenta il numero di bande comuni tra a e b, n_a il numero totale di bande in a e n_b il numero totale di bande presenti in b, è stata calcolata la matrice di similarità dalla quale è stato ottenuto il dendrogramma UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean). A partire dalla matrice di similarità è stata ricavata la matrice cofenetica per valutare l'affidabilità dei raggruppamenti ottenuti comparando le due matrici utilizzando il Mantel test. L'analisi è stata condotta mediante i software NTSYS-PC versione 2.2, e SYN-TAX 2000.

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Osservazioni morfologiche sulla *N. wuttkei*

Dai rilievi effettuati in serra è stato osservato che la *N. wuttkei* è una pianta erbacea di 1 m di altezza (Foto 3) con foglie che allo stadio giovanile si dipartono da una rosetta basale con forma da ovata a ellittica passando dalle basali alle apicali (Foto 4). Alla maturità le foglie sono picciolate sia le radicali che le cauline; l'apice si presenta da acuto ad acuminato e la base da cuneata ad attenuata; il picciolo è alato di lunghezza variabile da 2 a 5 cm. La fioritura è stata osservata dopo circa 65 giorni dalla semina. L'infiorescenza è a pannocchia con fiori di colore bianco (Foto 5). Il tubo corollinico è lungo circa 18 mm e largo circa 3 mm; il calice è pentagamosepalo di circa 8 mm di lunghezza (Foto 6). La corolla è pentagamopetala con lembo di circa 10 mm di diametro; i lobi emarginati fusi per circa 2/3 della loro lunghezza (Foto 7).

I 4 stami che arrivano a livello della gola del tubo corollinico sono inclusi con la parte libera del filamento lunga solo 1-1,5 mm; il quinto stame, posto più in basso, presenta la porzione libera del filamento lunga circa 10 mm. La capsula è ovata e lunga circa 9 mm. I semi sono reniformi aventi dimensioni di circa 0,9 mm, con superficie ornata di creste serpentine. Dalle nostre osservazioni morfologiche, nel suo aspetto generale la *N. wuttkei* presenta analogie con la *N. maritima*, l'infiorescenza è simile a quella della *N. amplexicaulis*. Per quanto riguarda le dimensioni del fiore sono state osservate affinità con la *N. amplexicaulis*, la *N. maritima*, la *N. exigua*, la *N. velutina*, la *N. goodspeedii* e la *N. rotundifolia*. In particolare, per quanto riguarda il rapporto di lunghezza tubo corollinico-calice della *N. wuttkei* (Foto 8), le maggiori analogie sono state riscontrate con la *N. exigua* (Foto 9).



Foto 3. *Nicotiana wuttkei*



Foto 4. Foglie da basali ad apicali di *Nicotiana wuttkei*



Foto 5. Infiorescenza di *Nicotiana wuttkei*

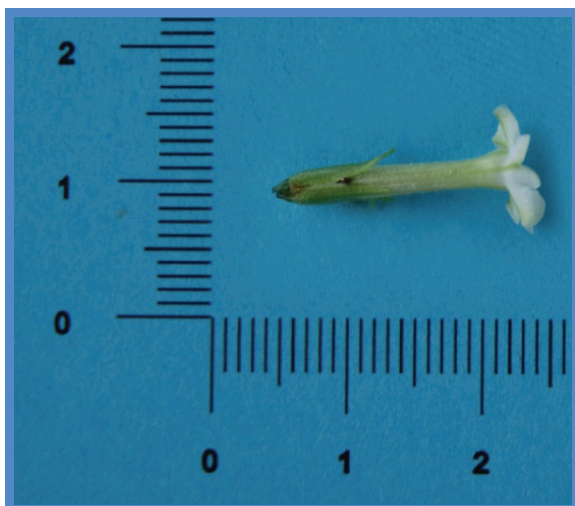


Foto 6. Fiore di *Nicotiana wuttkei*

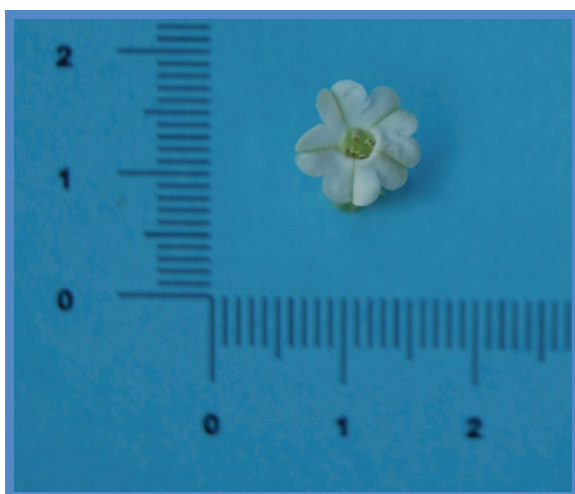


Foto 7. Fiore di *Nicotiana wuttkei*

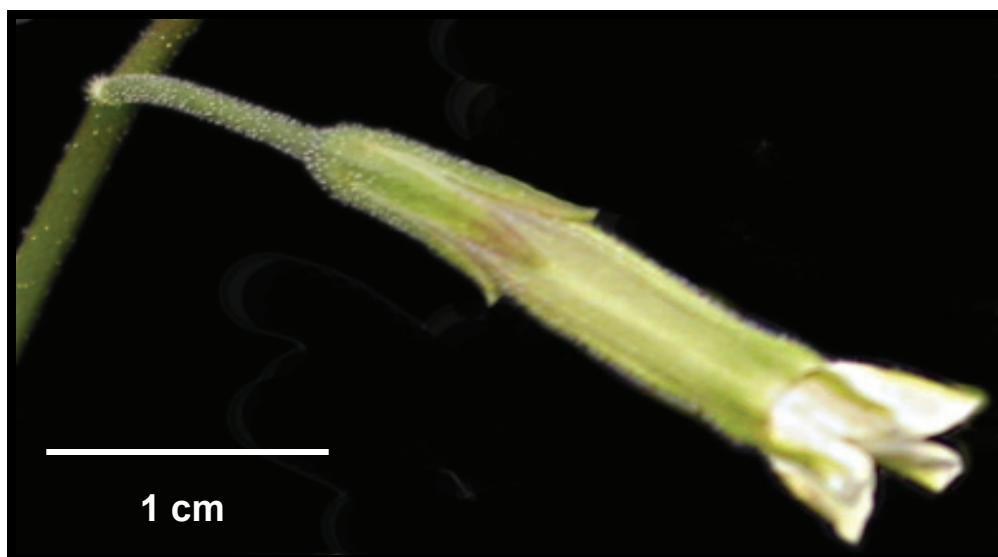


Foto 8. Fiore di *N. wuttkei*



Foto 9. Fiore di *N. exigua*

3.2 Determinazione del numero dei cromosomi

Al fine di determinare l'esatto corredo cromosomico della *N. wuttkei* è stato ottimizzato un protocollo sperimentale già utilizzato per studi sulla *N. tabacum* (Cersosimo and Sorrentino, 1997). Tale protocollo prevedeva il trattamento degli apici radicali con una soluzione di colchicina 0,1% per 3 ore e la successiva colorazione di Feulgen. Con questa procedura le metafasi osservate per la *N. wuttkei* non si presentavano idonee al conteggio dei cromosomi, in quanto la colchicina aveva indotto un accorciamento eccessivo. Sono stati condotti degli esperimenti a diverse concentrazioni di colchicina in presenza ed assenza della 8-idrossichinolina a tempi diversi. Le condizioni ottimali sono state ottenute incubando gli apici radicali in 0,05% colchicina e 0,025% 8-idrossichinolina per 3h e 30'. Il procedimento della colorazione è rimasto invariato. Il protocollo ottimizzato è stato utilizzato in esperimenti per la determinazione del numero di cromosomi della *N. wuttkei* e di altre due specie di *Nicotiana* sect. *Suaveolentes* a ploidia, nota la *N. alata* (n=9) e la *N. suaveolens* (n=16). Le osservazioni effettuate su queste due specie in esame hanno confermato la loro ploidia (Foto 10 e 11). Per la *N. wuttkei* è stato determinato un numero di cromosomi medio di 32 cromosomi (Foto 12 e 13). I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 4.

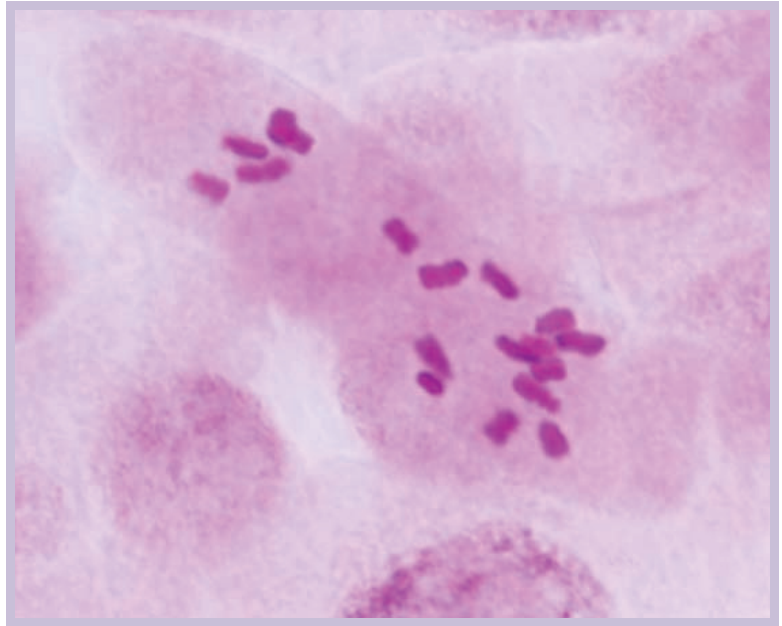


Foto 10. Cromosomi in metafase di *N. alata* $2n=18$

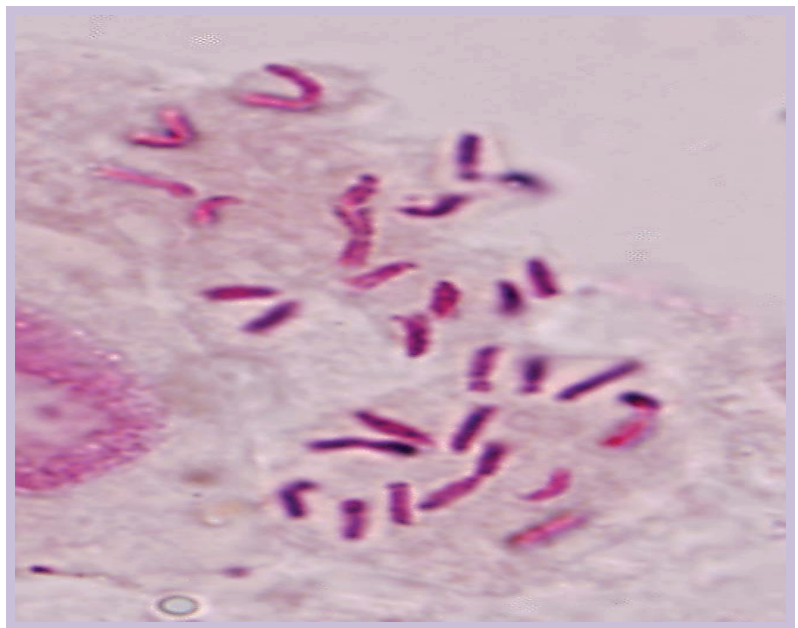


Foto 11. Cromosomi in metafase di *N. suaveolens* $2n=32$

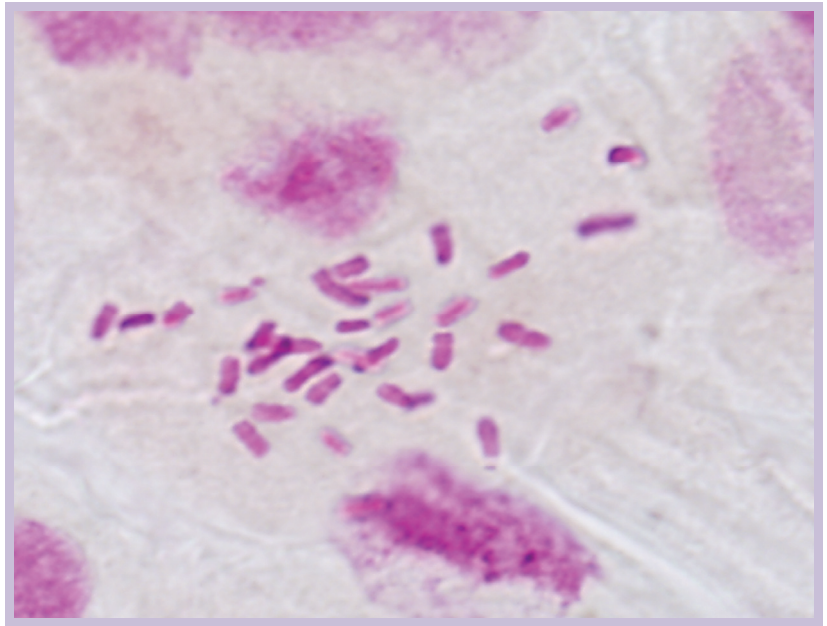


Foto 12. Cromosomi in metafase di *N. wuttkei* $2n=32$

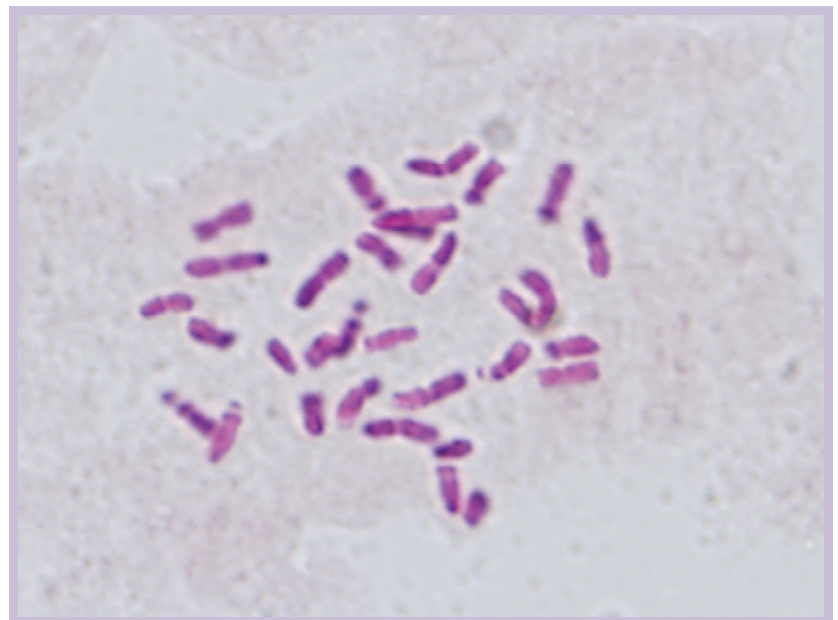


Foto 13. Cromosomi in metafase di *N. wuttkei* $2n=32$

Tabella 4. Numero di cromosomi stimato per ciascuna specie esaminata.

Specie in esame	Media dei cromosomi per cellula	Cariotipo riportato in letteratura
<i>N. alata</i>	$18 \pm 0,3$	18
<i>N. suaveolens</i>	$32 \pm 0,6$	32
<i>N. wuttkei</i>	$32 \pm 0,4$	28-32

3.3 Analisi della variabilità genetica delle specie esaminate mediante marcatori molecolari ISSR

L'analisi del polimorfismo rivelato dai marcatori molecolari ISSR è stata eseguita, al fine di valutare le relazioni genetiche tra la *N. wuttkei* e le altre specie di *Nicotiana*, della sezione *Suaveolentes*. Per questo lavoro, sono state esaminate 22 specie delle quali 21 appartenenti alla sezione *Suaveolentes* e la *N. tabacum* (sezione *Nicotiana*), quale specie esterna alla sezione. Il DNA genomico è stato amplificato usando primer ISSR, ancorati in 3' o in 5'; undici sono stati selezionati in base alla chiarezza e riproducibilità delle bande (Tabella 5). Tutti i primer hanno rivelato pattern polimorfici e generalmente caratteristici per ciascuna specie. La figura 23 riporta i profili di amplificazione generati dal primer UBC 845 che presenta la sequenza ripetuta CA e nucleotidi RC in 3'. Le bande osservate hanno dimensioni comprese tra 2800-400 coppie di basi. La figura 24 riporta i profili di amplificazione generati dal primer P7 che presenta la sequenza ripetuta CA e nucleotidi GG al 3'; si osservano per le diverse specie bande aventi dimensioni comprese tra 1500-300 coppie di basi. Per questo primer si può osservare che i pattern elettroforetici delle diverse *Nicotianae* presentano bande comuni a diverse specie e specie-specifiche, come ad esempio per il prodotto di amplificazione di circa 1300 bp in *N. simulans* e di circa 950 bp in *N. excelsior*. La figura 25 riporta il profilo di amplificazione generato dal primer P1 che presenta la sequenza ripetuta CA e nucleotidi AAG al 3'; possiamo osservare bande aventi dimensioni comprese tra 1800-300 coppie di basi. I pattern elettroforetici mostrano una banda di circa 550 bp comune a tutte le *Suaveolentes* assente in *N. tabacum*. Nella figura 26 sono riportati i profili di amplificazione generati dal primer UBC826 che presenta una sequenza ripetuta AC e nucleotidi C al 3'; esso genera bande aventi dimensioni comprese tra 1700-300bp. La figura 27 riporta il profilo di amplificazione generato del primer UBC 855 con sequenza ripetuta AC e nucleotidi YT al 3'; le bande generate hanno dimensioni comprese tra 1850-300 bp. I prodotti di amplificazione generati con il primer L2 (Figura 28) che presenta una sequenza ripetuta AG e nucleotidi YA al 3' hanno dimensioni

comprese tra 1700-300 bp. La figura 29 riporta il profilo di amplificazione generato dal primer P834 che presenta la sequenza ripetuta AG e i nucleotidi CTT al 3'; si osservano bande aventi dimensioni comprese tra 2200-400 coppie di basi. Il primer UBC 840C (Figura 30) che presenta una sequenza ripetuta GA e nucleotidi CT al 3', genera bande aventi dimensioni comprese tra 1800-300bp. La figura 31 riporta il profilo di amplificazione generato dal primer UBC844 che presenta una sequenza ripetuta CT e nucleotidi RC al 3'; esso genera bande aventi dimensioni comprese tra 1700-300bp. Il profilo di amplificazione generato dal primer P15 (Figura 32), con la sequenza ripetuta (CA)₇C e i nucleotidi GGT in 5', presenta bande aventi dimensioni comprese tra 1700-200 bp. Nella figura 33 è riportato il profilo di amplificazione, generato dal primer 8565 con sequenza ripetute (CAC)₇ e ancorato in 5' e i nucleotidi GT al 5'; esso genera bande aventi dimensioni comprese tra 2000-200 bp.

Tabella 5. Primer ISSR selezionati.

	Primer ancorati in 3'		Primer ancorati in 5'
UBC845	(CA)₈RC	P15	GGT(CA)₇C
P7	(CA)₈GG	8565	GT(CAC)₇
P1	(CA)₈AAG		
UBC826	(AC)₈C		
UBC855	(AC)₈YT		
L2	(AG)₈YA		
P834	(AG)₈CTT		
UBC840C	(GA)₈CT		
UBC844	(CT)₈RC		

Y=(C,T); R=(A,G); B=non A; D=non C

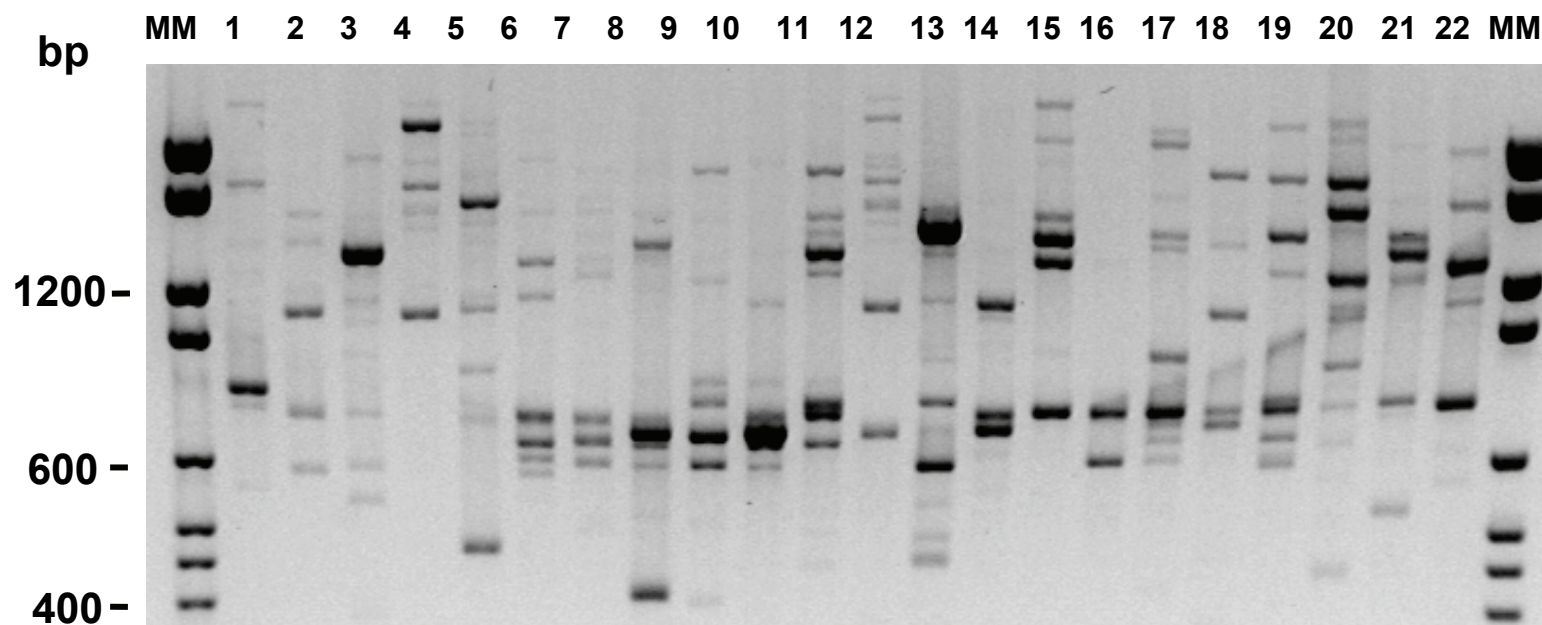


Fig. 23. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer UBC 845 [(CA)₈ RC] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

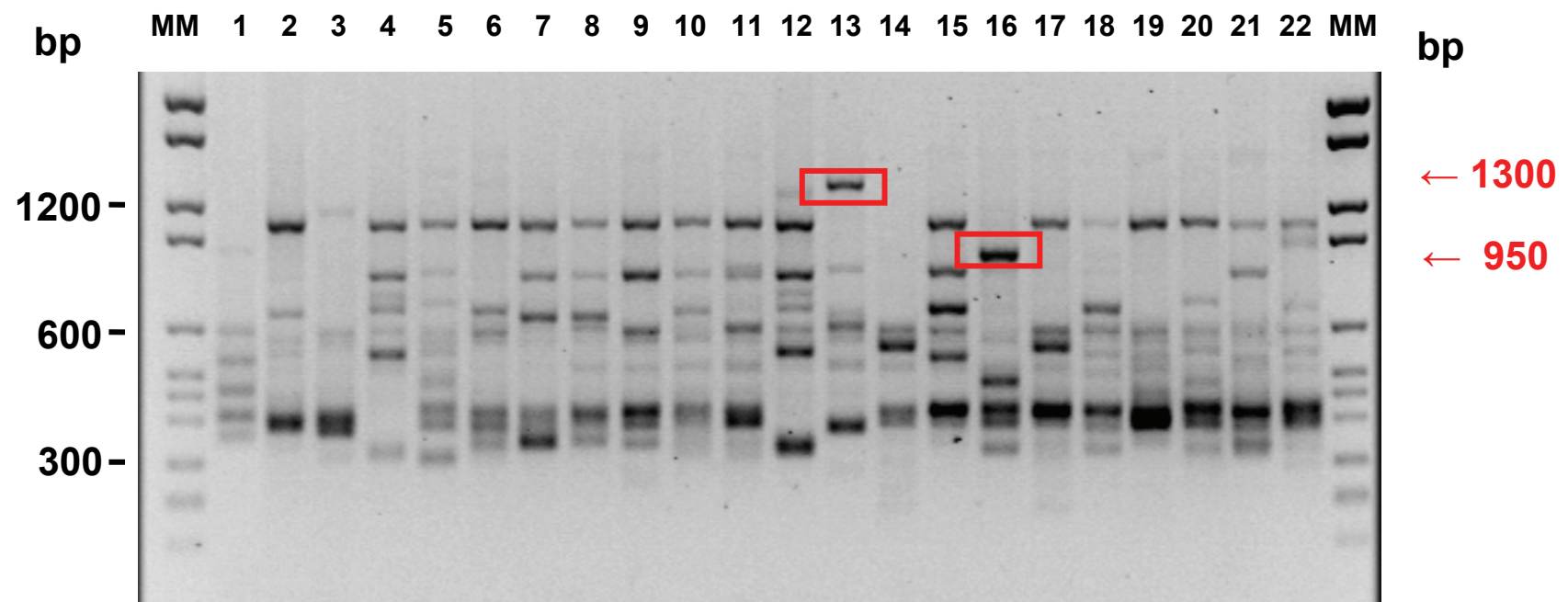


Fig. 24. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer P7 [(CA)₈ GG] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*. Si osserva una banda specifica di 1300 bp in *N. simulans* e di circa 950 bp in *N. excelsior*.

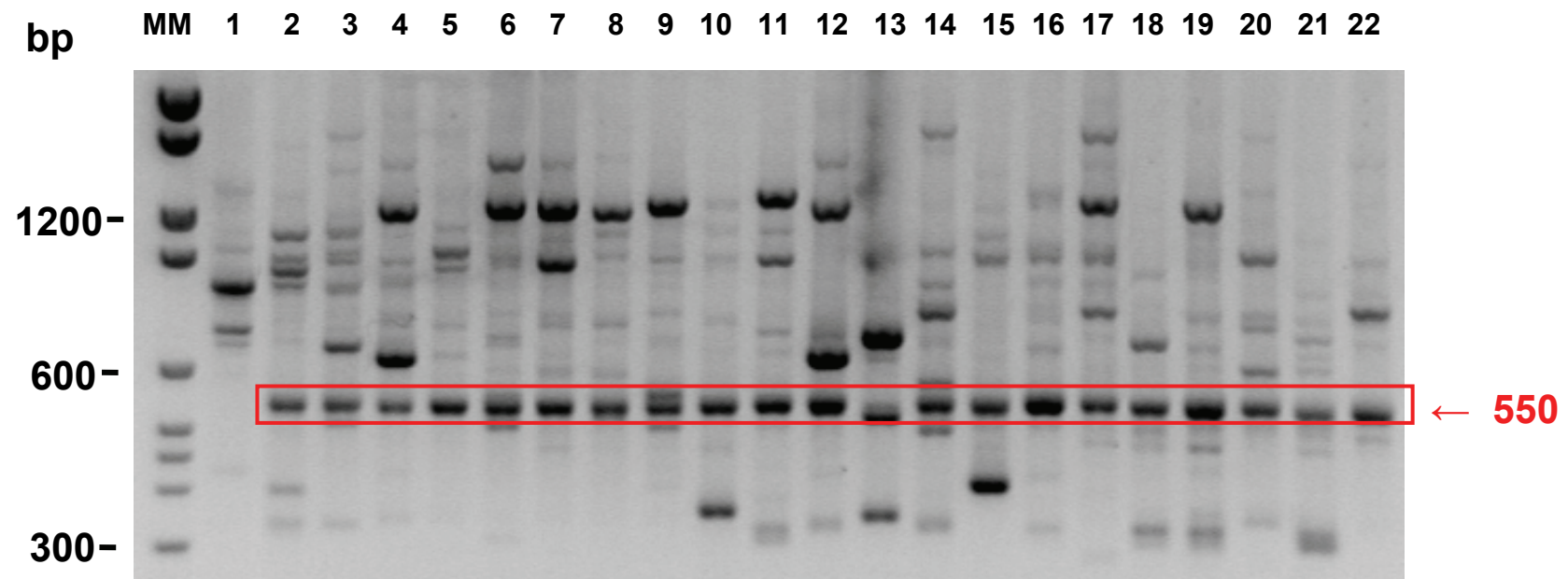


Fig. 25. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer P1 [(CA)₈ AAG] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*. Si osservano bande comuni di 550 bp in tutte le Suaveolentes tranne in *N. tabacum*.

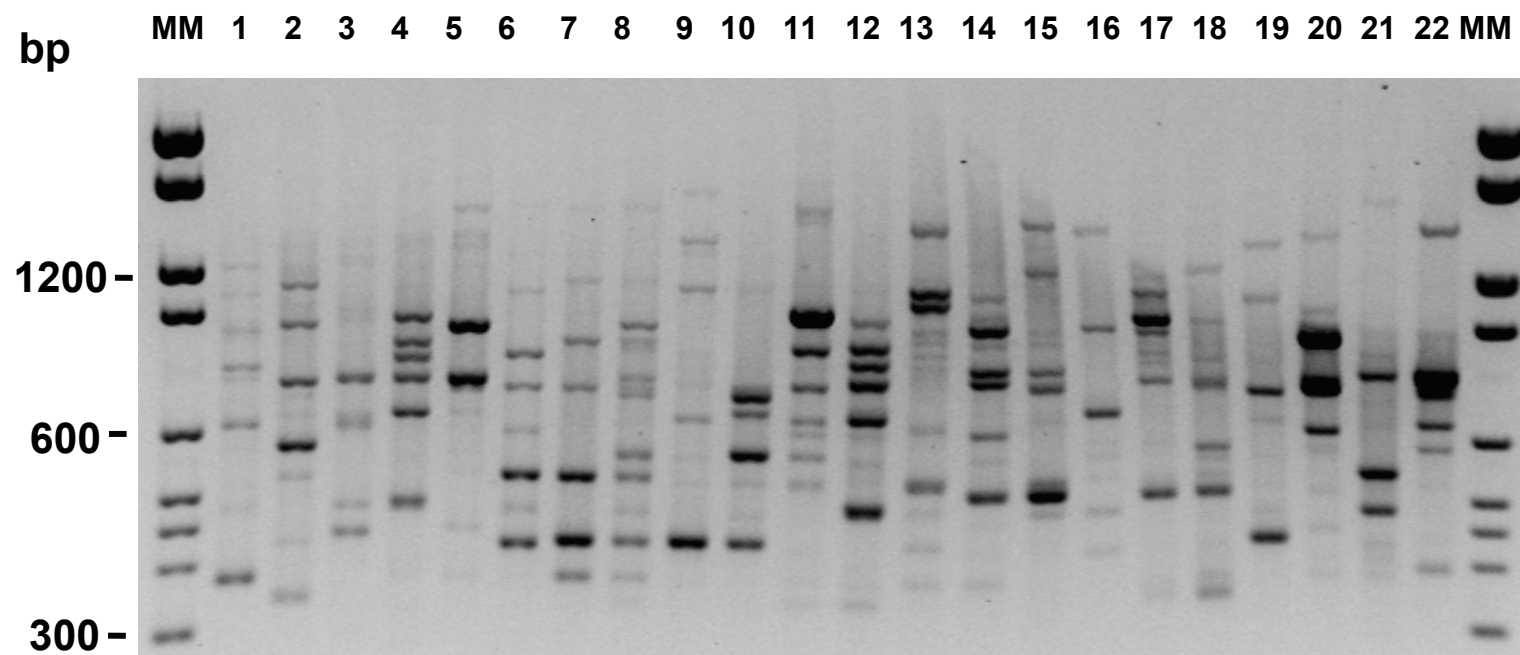


Fig. 26. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer UBC 826 [(AC)₈C] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

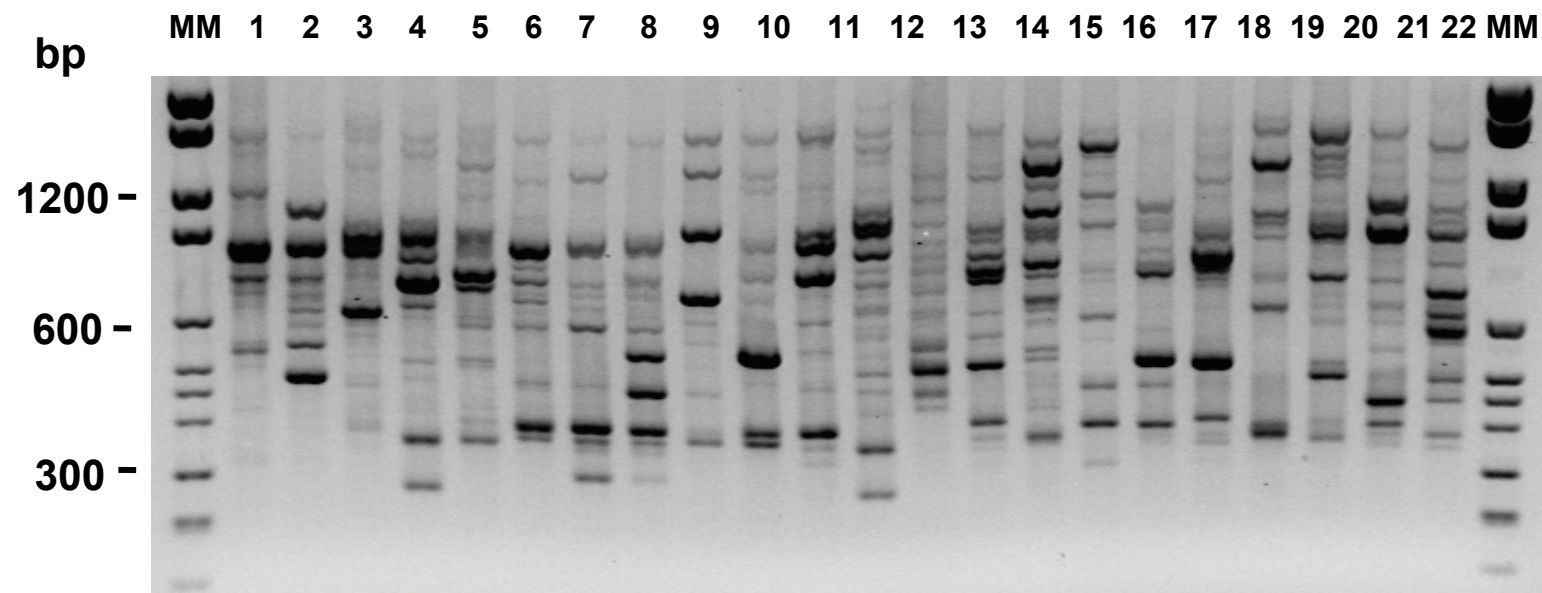


Fig. 27. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer UBC 855 [(AC)₈ YT] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

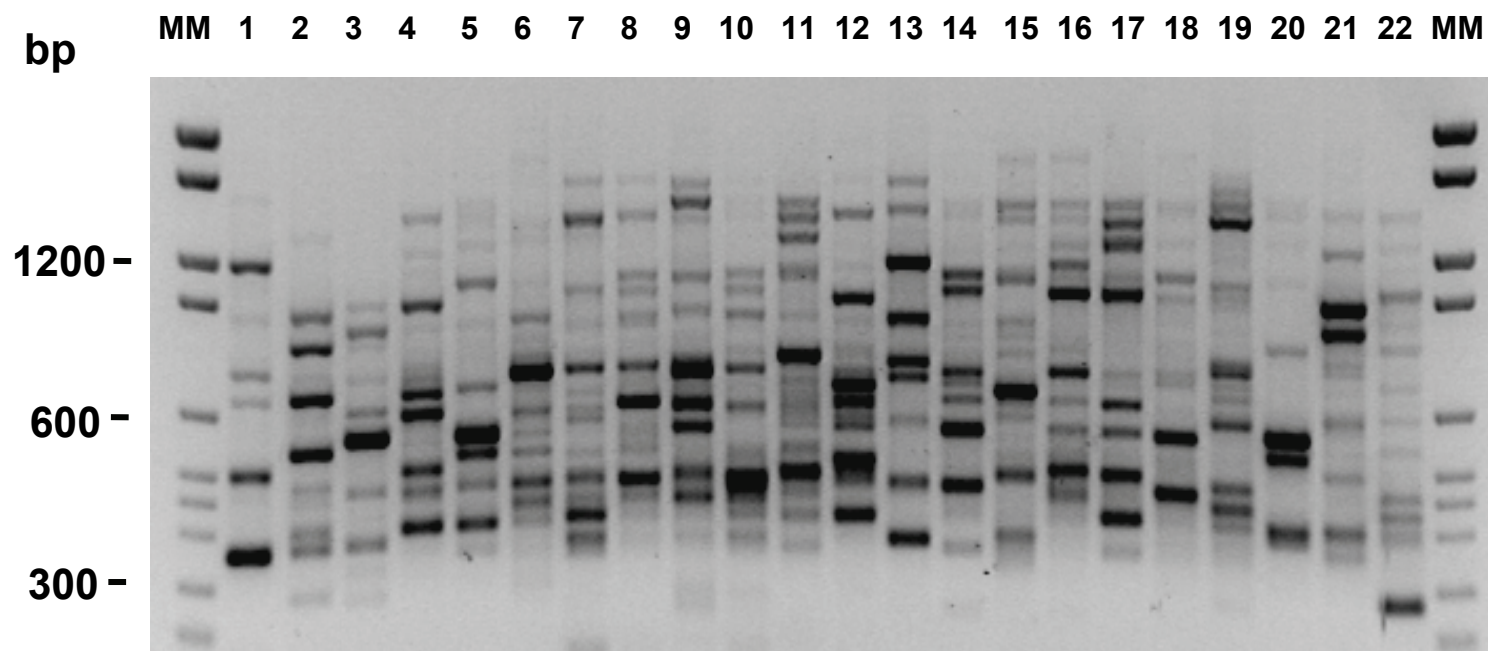


Fig. 28. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer L2 [(AG)₈ YA] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

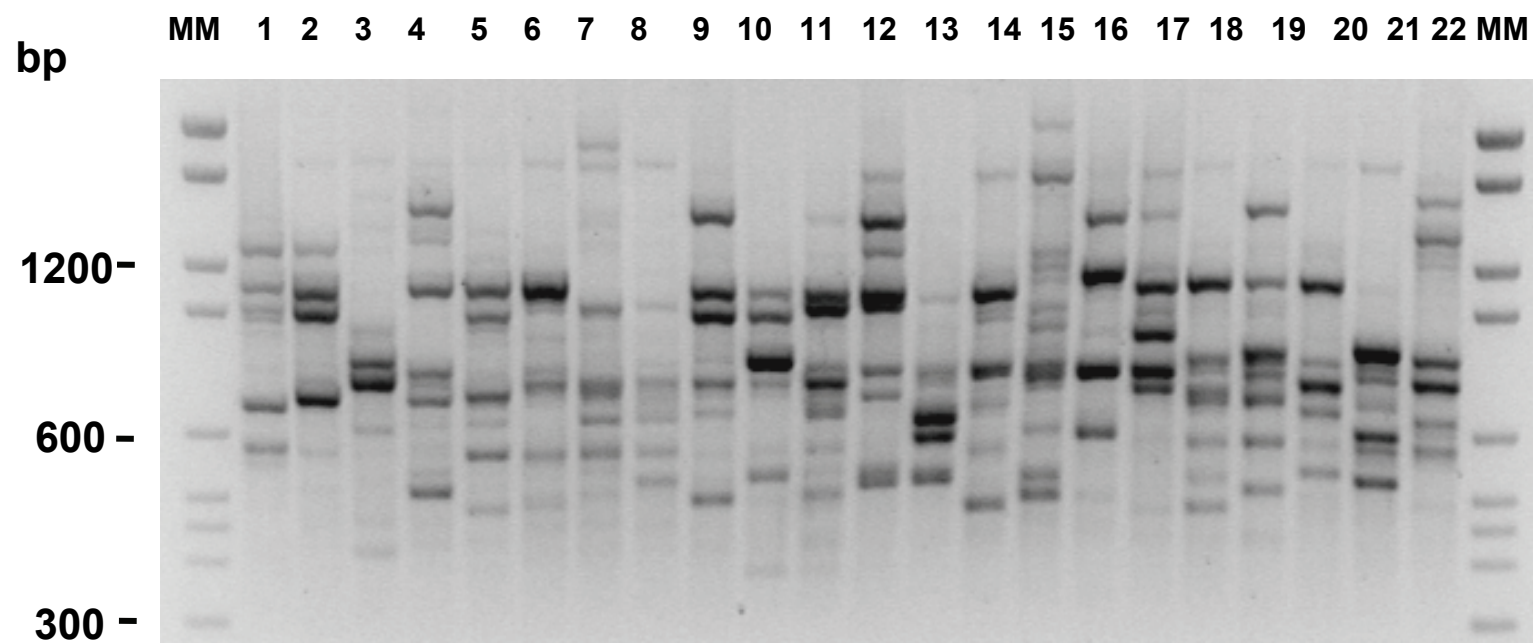


Fig. 29. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer P 834 [(AG)₈ CCT] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

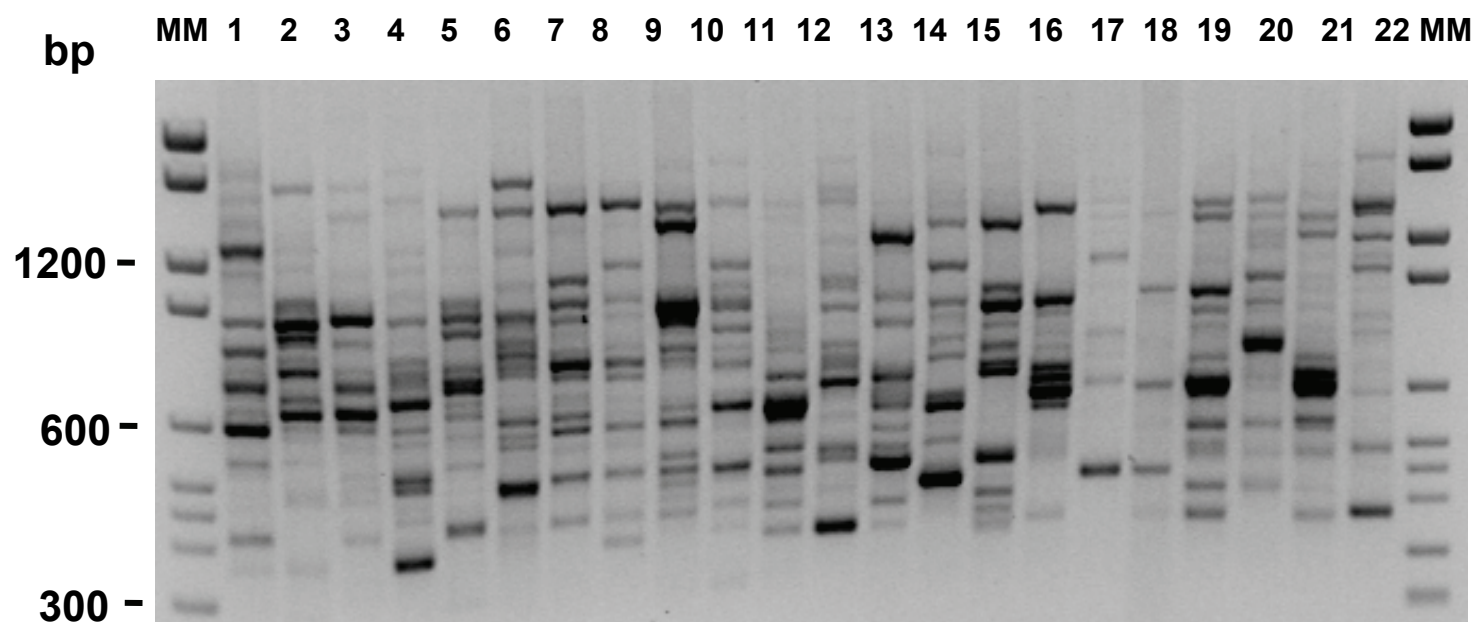


Fig. 30. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer UBC 840C [(GA)₈ CT] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

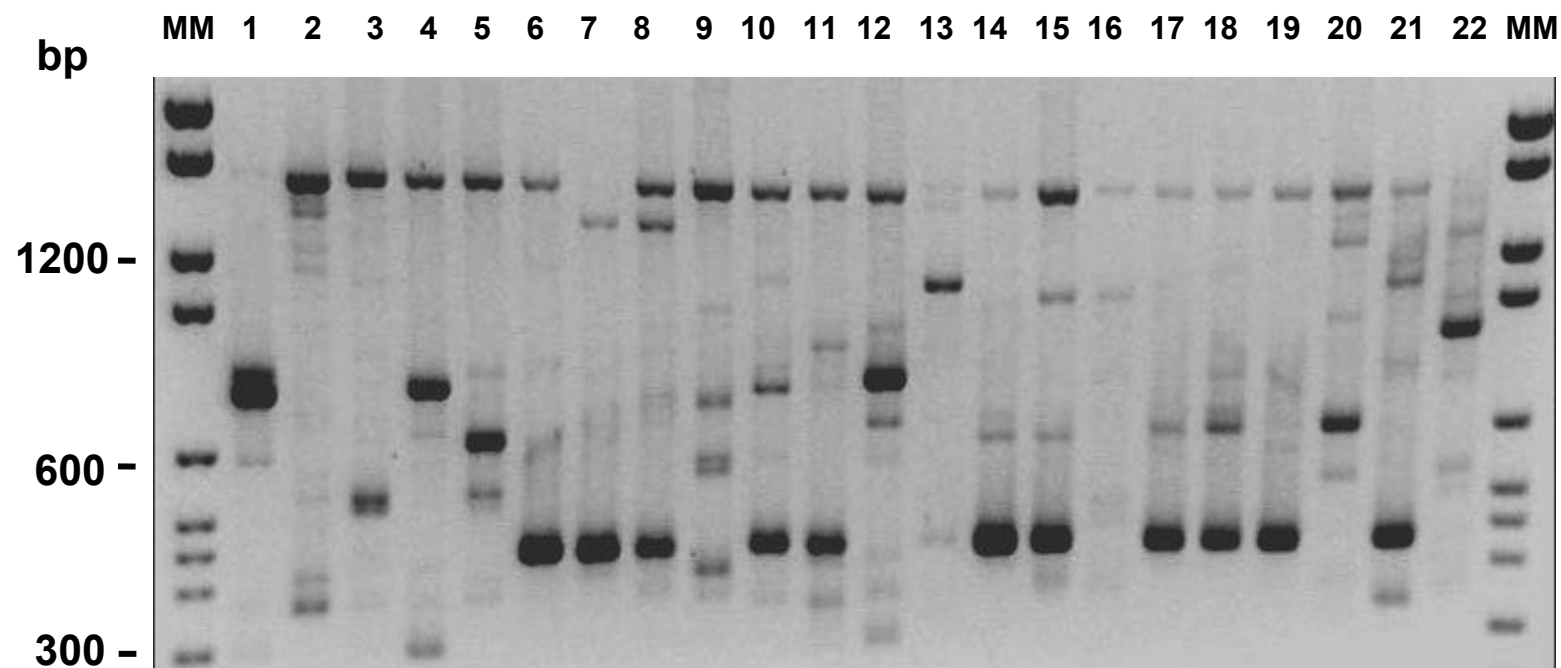


Fig. 31. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer UBC 844 [(CT)₈RC] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

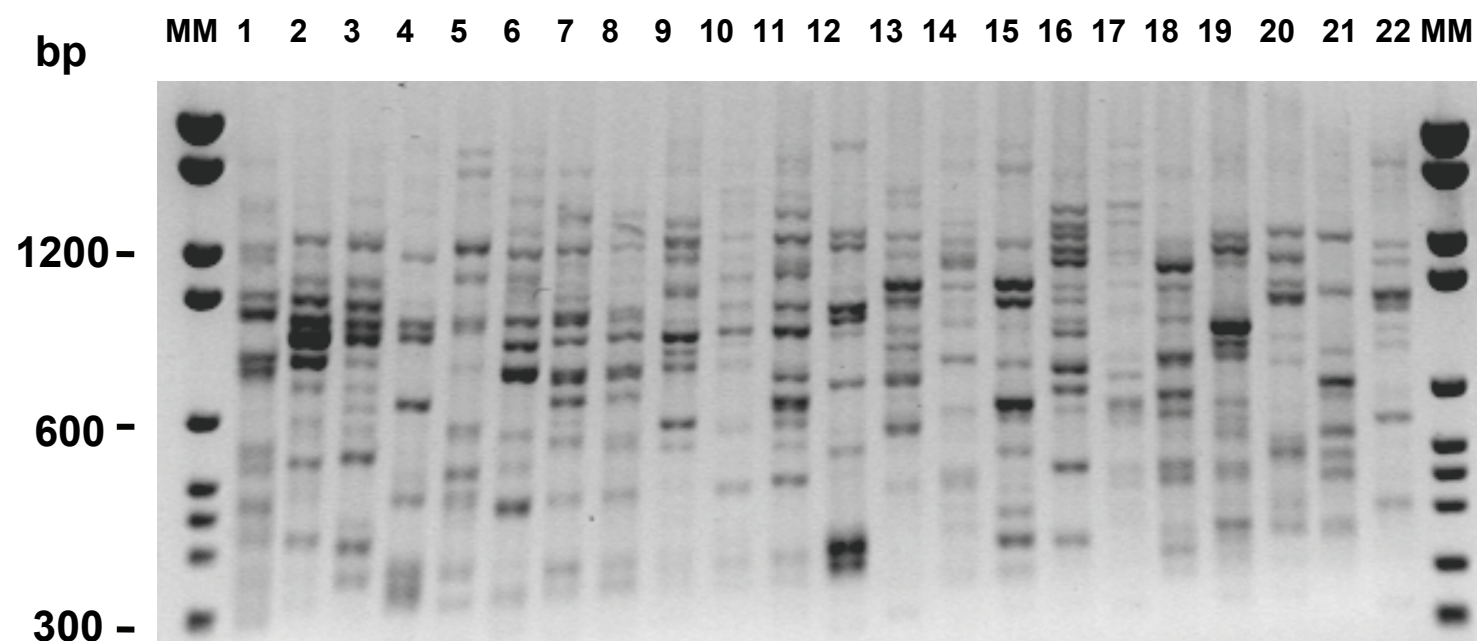


Fig. 32. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer P15 [GGT(CA)₇ C] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

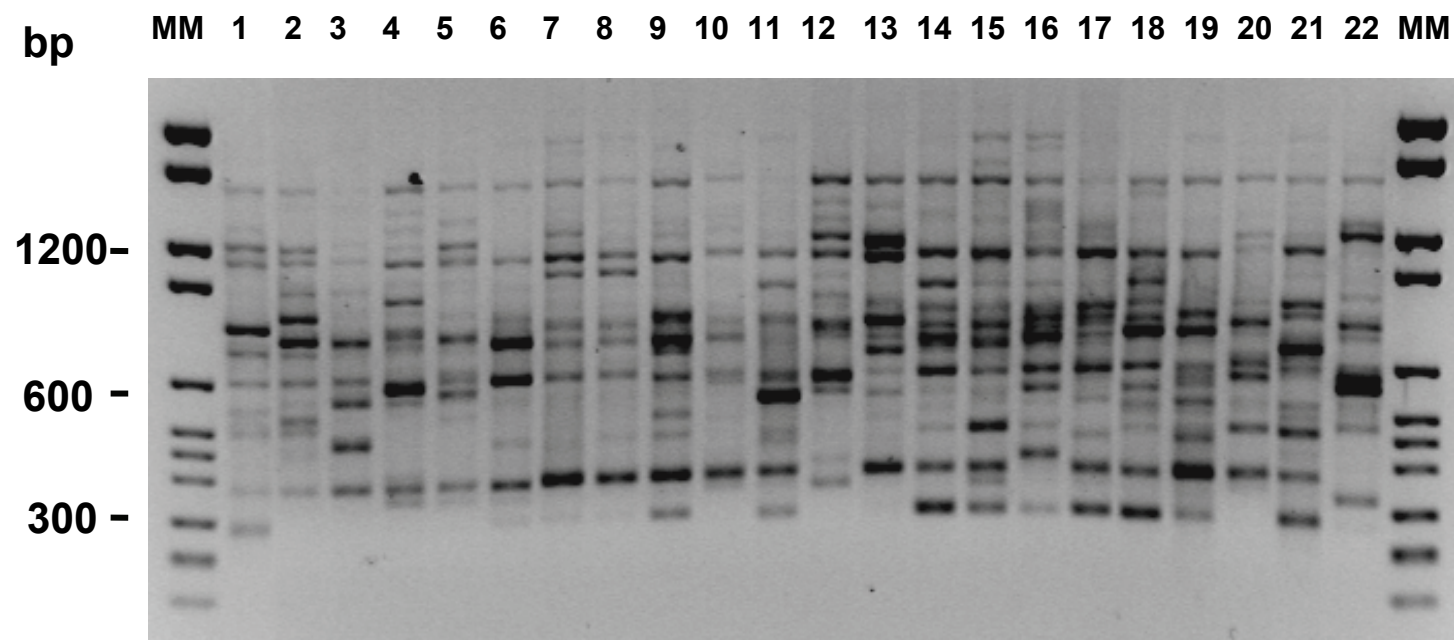


Fig. 33. Profili di amplificazione ISSR generati dal primer 8565 [GT(CAC)₇] con DNA estratto da 22 specie di *Nicotiana*. Corsie da 1 a 22: 1) *N. tabacum*; 2) *N. benthamiana*; 3) *N. umbratica*; 4) *N. cavicola*; 5) *N. debneyi*; 6) *N. gossei*; 7) *N. amplexicaulis*; 8) *N. maritima*; 9) *N. wuttkei*; 10) *N. velutina*; 11) *N. hesperis*; 12) *N. occidentalis*; 13) *N. simulans*; 14) *N. megalosiphon*; 15) *N. rotundifolia*; 16) *N. excelsior*; 17) *N. suaveolens*; 18) *N. ingulba*; 19) *N. exigua*; 20) *N. goodspeedii*; 21) *N. rosulata*; 22) *N. africana*.

Nella tabella 6 sono riassunti i risultati ottenuti con i primer selezionati. I primer analizzati hanno generato da 23 a 33 prodotti di amplificazione aventi dimensioni comprese tra 200 a 2800 coppie di basi. E' stato evidenziato un totale di 302 bande, risultate tutte polimorfiche. I dati di presenza e assenza delle bande hanno consentito di costruire una matrice binaria (0-1). Utilizzando il coefficiente di Jaccard è stata calcolata la matrice di similarità (Figura 34) dalla quale è stato ottenuto il dendrogramma UPGMA (Figura 35).

Il coefficiente di correlazione cofenetico r è stato calcolato con il test di Mantel (Mantel, 1967) comparando la matrice cofenetica con la matrice iniziale di similarità, allo scopo di stimare quanto bene il dendrogramma rappresenta la sua corrispondente matrice di distanza. Il coefficiente di correlazione cofenetico ottenuto è stato 0,81, che indica che il dendrogramma era una buona rappresentazione dei dati originali.

Dal dendrogramma si osserva che al nodo 0,156 si separano due cluster uno costituito dalla sola *N. tabacum* e l'altro comprendente tutte le altre specie appartenenti alla sezione *Suaveolentes*. Questo raggruppamento risulta successivamente diviso al nodo 0,169 in un gruppo costituito dalla sola *N. africana* che forma un gruppo parallelo alle altre specie della sezione *Suaveolentes* costituenti l'altro gruppo. Quest'ultimo si divide a sua volta in un gruppo costituito dalla sola *N. simulans* e in un gruppo costituito da tutte le altre specie. Quest'ultimo gruppo si suddivide successivamente in due gruppi di cui uno costituito da 3 specie (*N. benthamiana*, *N. debneyi* e *N. umbratica*) e l'altro da tutte le altre specie che a loro volta si separano al nodo 0,209 in due gruppi uno comprendente 5 specie (*N. rosulata*, *N. goodspeedii*, *N. exigua*, *N. ingulba*, *N. megalosiphon*) e l'altro le rimanenti. Da questo raggruppamento al nodo 0,215 si separa la *N. excelsior*, mentre le altre si separano al nodo 0,224 in due gruppi di cui uno costituito da 3 specie (*N. rotundifolia*, *N. occidentalis*, *N. cavicola*) l'altro contenenti le rimanenti 7 specie. Queste ultime al nodo 0,234 si separano in ulteriori due sottogruppi, uno costituito dalla *N. suaveolens* e dalla *N. hesperis* e l'altro dalle 5 specie che al nodo 0,292 si separano in due raggruppamenti uno

costituito da *N. gossei*, *N. amplexicaulis* e *N. maritima*, e l'altro da *N. velutina* e da *N. wuttkei*.

Tabella 6. Prodotti di amplificazione ottenuti per ciascuno dei primer analizzati.

Primer	Sequenze 5' – 3'	Bande polimorfiche	bp range
UBC845	(CA)₈RC	23	2800-400
P7	(CA)₈GG	25	1500-300
P1	(CA)₈AAG	30	1800-300
UBC826	(AC)₈C	23	1700-300
UBC855	(AC)₈YT	31	1850-300
L2	(AG)₈YA	31	1800-200
Y P834	(AG)₈CTT	29	2200-400
UBC840C	(GA)₈CT	33	1800-300
UBC844	(CT)₈RC	24	1700-300
P15	GGT(CA)₇C	30	1700-200
8565	GT(CAC)₇	23	2000-200

Y=(C,T); R=(A,G); B=non A; D=non C

	<i>N.tabacum</i>	<i>N.benthamiana</i>	<i>N.umbratica</i>	<i>N.cavicola</i>	<i>N.debneyi</i>	<i>N.gosseii</i>	<i>N.amplexicaulis</i>	<i>N.maritima</i>	<i>N.wuttkei</i>	<i>N.velutina</i>	<i>N.hesperis</i>	<i>N.occidentalis</i>	<i>N.simulans</i>	<i>N.megalosiphon</i>	<i>N.rotundifolia</i>	<i>N.excelsior</i>	<i>N.suaveolens</i>	<i>N.ingulba</i>	<i>N.exigua</i>	<i>N.goodspeedii</i>	<i>N.rosulata</i>	<i>N.africana</i>
<i>N.tabacum</i>	1.000																					
<i>N.benthamiana</i>	0.185	1.000																				
<i>N.umbratica</i>	0.140	0.212	1.000																			
<i>N.cavicola</i>	0.123	0.175	0.176	1.000																		
<i>N.debneyi</i>	0.174	0.218	0.200	0.229	1.000																	
<i>N.gosseii</i>	0.134	0.267	0.178	0.243	0.231	1.000																
<i>N.amplexicaulis</i>	0.123	0.186	0.165	0.252	0.196	0.357	1.000															
<i>N.maritima</i>	0.140	0.204	0.151	0.248	0.214	0.311	0.545	1.000														
<i>N.wuttkei</i>	0.134	0.195	0.114	0.175	0.165	0.261	0.248	0.254	1.000													
<i>N.velutina</i>	0.175	0.221	0.177	0.187	0.176	0.260	0.283	0.358	0.396	1.000												
<i>N.hesperis</i>	0.195	0.185	0.124	0.156	0.146	0.197	0.226	0.300	0.287	0.264	1.000											
<i>N.occidentalis</i>	0.156	0.205	0.127	0.301	0.195	0.227	0.195	0.231	0.167	0.207	0.262	1.000										
<i>N.simulans</i>	0.138	0.182	0.094	0.121	0.150	0.162	0.121	0.148	0.161	0.139	0.191	0.163	1.000									
<i>N.megalosiphon</i>	0.183	0.217	0.186	0.217	0.229	0.255	0.229	0.272	0.225	0.271	0.214	0.183	0.168	1.000								
<i>N.rotundifolia</i>	0.168	0.200	0.192	0.243	0.221	0.202	0.221	0.239	0.239	0.236	0.208	0.208	0.155	0.243	1.000							
<i>N.excelsior</i>	0.121	0.183	0.140	0.183	0.162	0.205	0.193	0.243	0.312	0.206	0.202	0.192	0.168	0.248	0.217	1.000						
<i>N.suaveolens</i>	0.147	0.209	0.157	0.209	0.209	0.232	0.219	0.259	0.248	0.168	0.292	0.236	0.164	0.288	0.233	0.237	1.000					
<i>N.ingulba</i>	0.157	0.240	0.170	0.216	0.228	0.194	0.170	0.235	0.224	0.194	0.224	0.191	0.165	0.322	0.243	0.235	0.330	1.000				
<i>N.exigua</i>	0.128	0.132	0.106	0.173	0.206	0.243	0.217	0.191	0.259	0.208	0.193	0.174	0.147	0.278	0.267	0.224	0.218	0.293	1.000			
<i>N.goodspeedii</i>	0.200	0.211	0.204	0.200	0.232	0.212	0.255	0.176	0.208	0.170	0.208	0.218	0.196	0.243	0.214	0.138	0.243	0.267	0.291	1.000		
<i>N.rosulata</i>	0.181	0.171	0.137	0.161	0.182	0.240	0.182	0.189	0.171	0.160	0.191	0.222	0.156	0.214	0.229	0.179	0.227	0.212	0.276	0.252	1.000	
<i>N.africana</i>	0.095	0.177	0.155	0.167	0.198	0.269	0.188	0.184	0.167	0.167	0.157	0.197	0.194	0.143	0.223	0.154	0.169	0.183	0.185	0.280	0.142	1.000

Figura 34. Matrice di similarità di Jaccard delle specie esaminate.

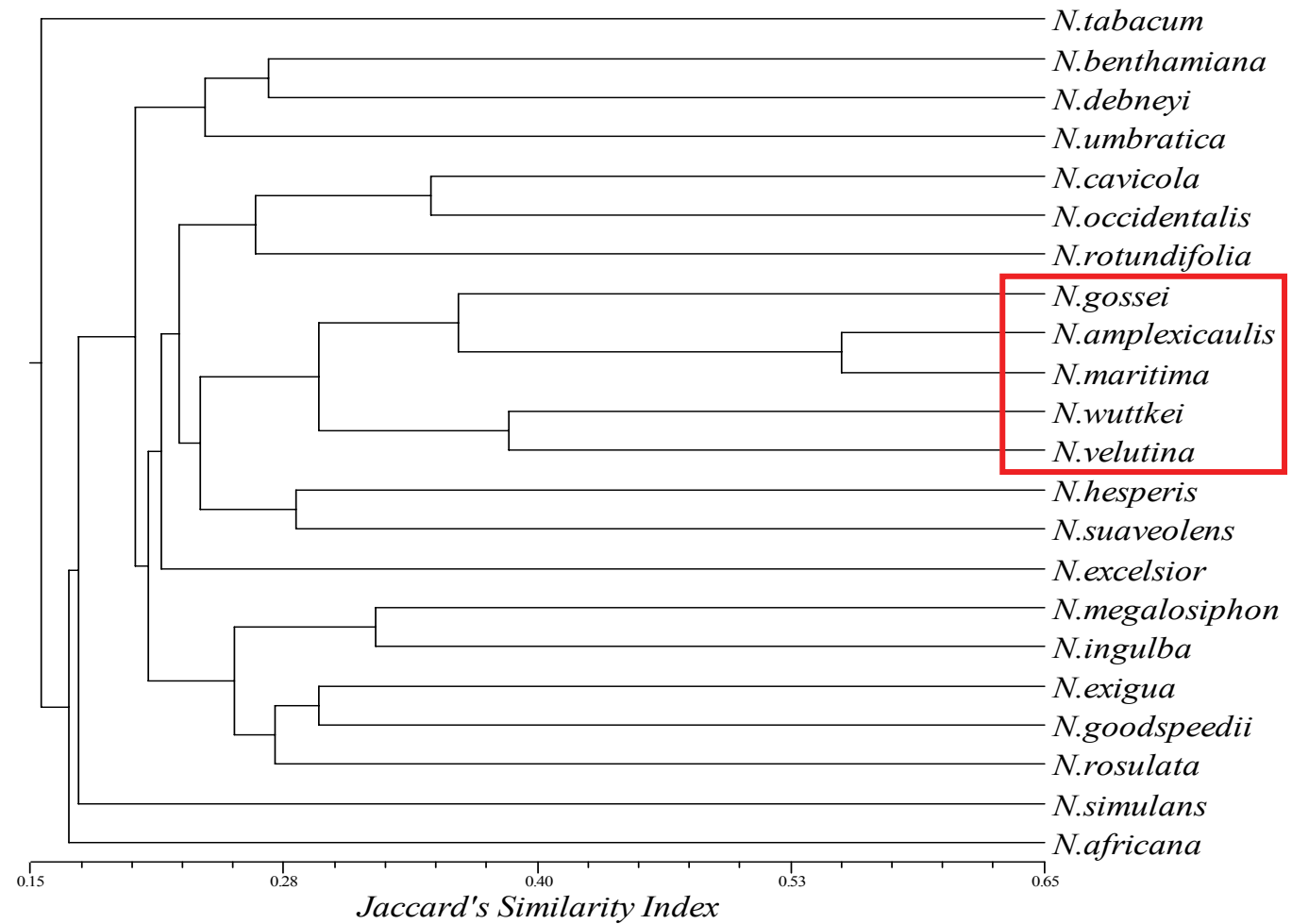


Figura 35. Dendrogramma UPGMA delle specie di *Nicotiana* esaminate. Il rettangolo rosso indica le specie con le quali la *N. wuttkei* risulta raggruppata.

Conclusioni

Le indagini effettuate mediante l'analisi del polimorfismo ISSR, l'analisi citologica e morfologica hanno fornito informazioni che possono contribuire alla caratterizzazione della *N. wuttkei* e ad un suo primo inquadramento sistematico.

Dalle nostre osservazioni morfologiche, nel suo aspetto generale la *N. wuttkei* presenta analogie con la *N. maritima*, l'infiorescenza è simile a quella della *N. amplexicaulis*. Per quanto riguarda le dimensioni del fiore sono state osservate affinità con la *N. amplexicaulis*, la *N. maritima*, la *N. exigua*, la *N. velutina*, la *N. goodspeedii* e la *N. rotundifolia*. In particolare, per quanto riguarda il rapporto di lunghezza tubo corollinico-calice della *N. wuttkei*, le maggiori analogie sono state riscontrate con la *N. exigua*.

Dagli studi citologici condotti sulla determinazione del numero cromosomico della *N. wuttkei* si rileva la presenza di numero cromosomico $n=16$, diversamente da quanto riportato da Clarkson & Symon (1991), ma in accordo con quanto riportato da Laskowska & Berbeć (2003). Inoltre è interessante notare che da studi d'incrocio condotti dagli stessi autori tra la *N. wuttkei* e le altre specie di *Nicotiana* sect. *Suaveolentes* con numero cromosomico $n=16$, sono stati ottenuti ibridi vitali solo da incroci con la *N. maritima* e con la *N. velutina*, con valori percentuali più elevati per quest'ultima.

Dall'analisi dei dati molecolari ottenuti la *N. wuttkei* è risultata raggruppata con le *Nicotianae* australiane. Dal dendrogramma infatti, risulta che la *N. tabacum* appartenente alla sezione *Nicotiana* costituisce un cluster separato dalle altre specie esaminate appartenenti alla sezione *Suaveolentes*. Quest'ultime risultano successivamente divise in due gruppi di cui uno costituito dalla sola *N. africana* e l'altro dalle *Nicotianae* australiane.

Quindi in accordo con quanto riportato in letteratura (Burns, 1982), l'analisi mediante marcatori molecolari ISSR ha evidenziato che la *N. africana* costituisce un ramo parallelo al gruppo delle altre specie della sezione *Suaveolentes*, con le quali condivide l'essere anfidiploide ($2n=46$).

La *N. wuttkei* è risultata inclusa all'interno del gruppo costituito da *N. velutina*, *N. maritima* e *N. amplexicaulis* con le quali presenta somiglianze morfologiche. Inoltre la *N. wuttkei* risulta raggruppata con due delle quattro specie appartenenti alla sezione *Suaveolentes* con numero cromosomico $n=16$. Tra le *Suaveolentes* esaminate la *N. velutina* è la specie che ha maggiore affinità genetica con la *N. wuttkei*.

L'insieme dei risultati ottenuti consente di formulare una prima ipotesi di origine della *N. wuttkei* sulla base dello schema filogenetico del genere *Nicotiana* proposto da Goodspeed (1954). Nella sua monografia del genere, Goodspeed ipotizzò che le specie della sezione *Suaveolentes* si fossero originate da un antico evento di ibridizzazione tra un membro delle *Alatae* e un altro genitore avente un pool genico derivante o dalla sezione *Acuminatae* o dalla sezione *Noctiflorae*. Nel diagramma filogenetico della sezione *Suaveolentes* (Figura 12), Goodspeed (1954) suggeriva un'ipotesi sull'origine delle 15 specie allora note come prodotti di ripetuti incroci e segregazioni dai progenitori di tre specie anfidiploidi rappresentanti le "specie base" della sezione: la *N. debneyi* ($n=24$), la *N. fragrans* ($n=24$) e la *N. suaveolens* ($n=16$).

La maggior parte delle specie della sezione *Suaveolentes* si sarebbe originata da un evento di ibridizzazione tra i progenitori della *N. debneyi* e della *N. suaveolens*, seguito da un reincrocio di un discendente o incrocio tra discendenti.

Secondo Goodspeed, l'ibridizzazione originale potrebbe essersi verificata nel sud-est dell'Australia dove gli areali delle due specie (*N. debneyi*, *N. suaveolens*) si sovrappongono.

Le altre specie si sarebbero originate come discendenti diretti di un ibrido tra i progenitori della *N. fragrans* e della *N. suaveolens*.

Secondo Goodspeed la *N. exigua*, la *N. maritima* e la *N. velutina* (tutte $n=16$) sembrano essere il prodotto di ripetuti reincroci della *N. suaveolens* con ibridi originatesi tra i progenitori della *N. debneyi* e della *N. suaveolens* con conservazione di alcuni caratteri della *N. debneyi* in particolare per la *N. exigua*.

La *N. maritima*, la *N. velutina* e la *N. exigua* si sarebbero differenziate rispettivamente nell'area meridionale, nella parte occidentale e nella parte orientale del sud-est dell'Australia.

Alla luce dell'insieme dei risultati ottenuti e sulla base di quanto postulato dal Goodspeed si può ipotizzare per la *N. wuttkei* un'origine comune alle tre specie sopra citate che hanno lo stesso numero di cromosomi, similarità genetica e/o somiglianze morfologiche (Figura 36).

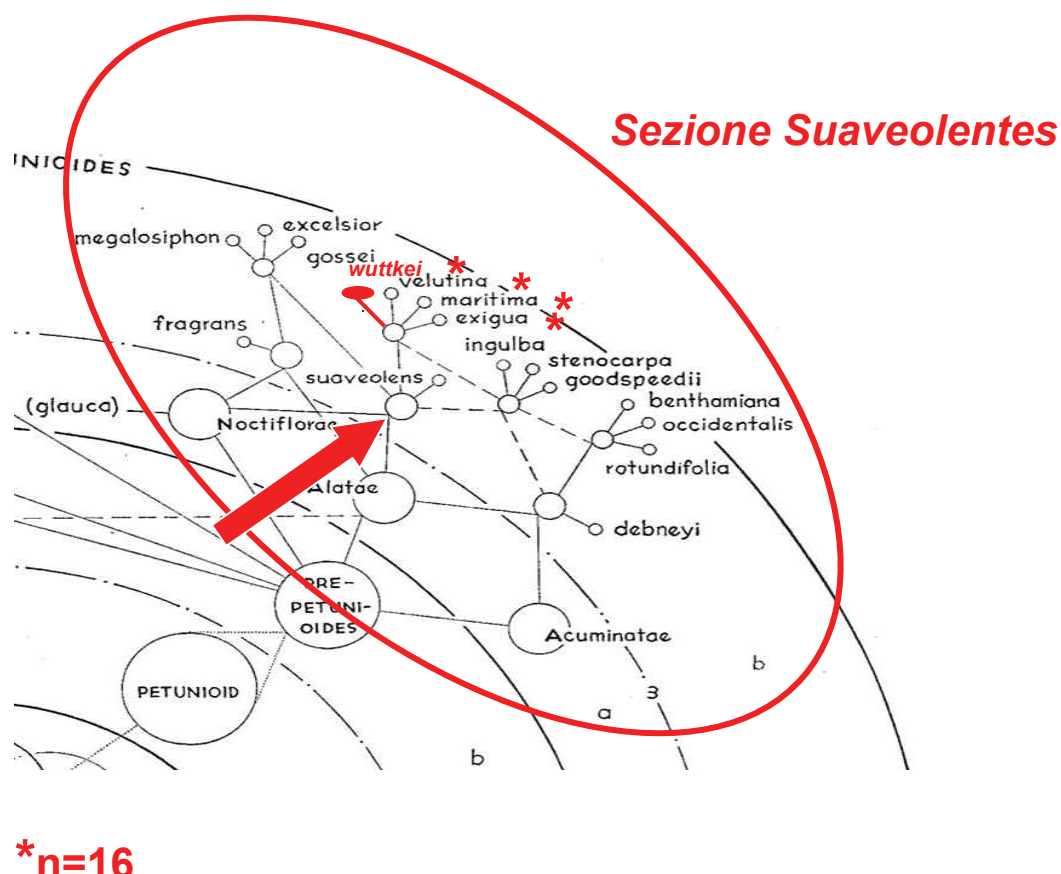


Figura 36. Ipotesi sull'origine filogenetica della *Nicotiana wuttkei*.

Tale ipotesi trova accordo anche con i dati di distribuzione geografica di queste specie (Figura 37).

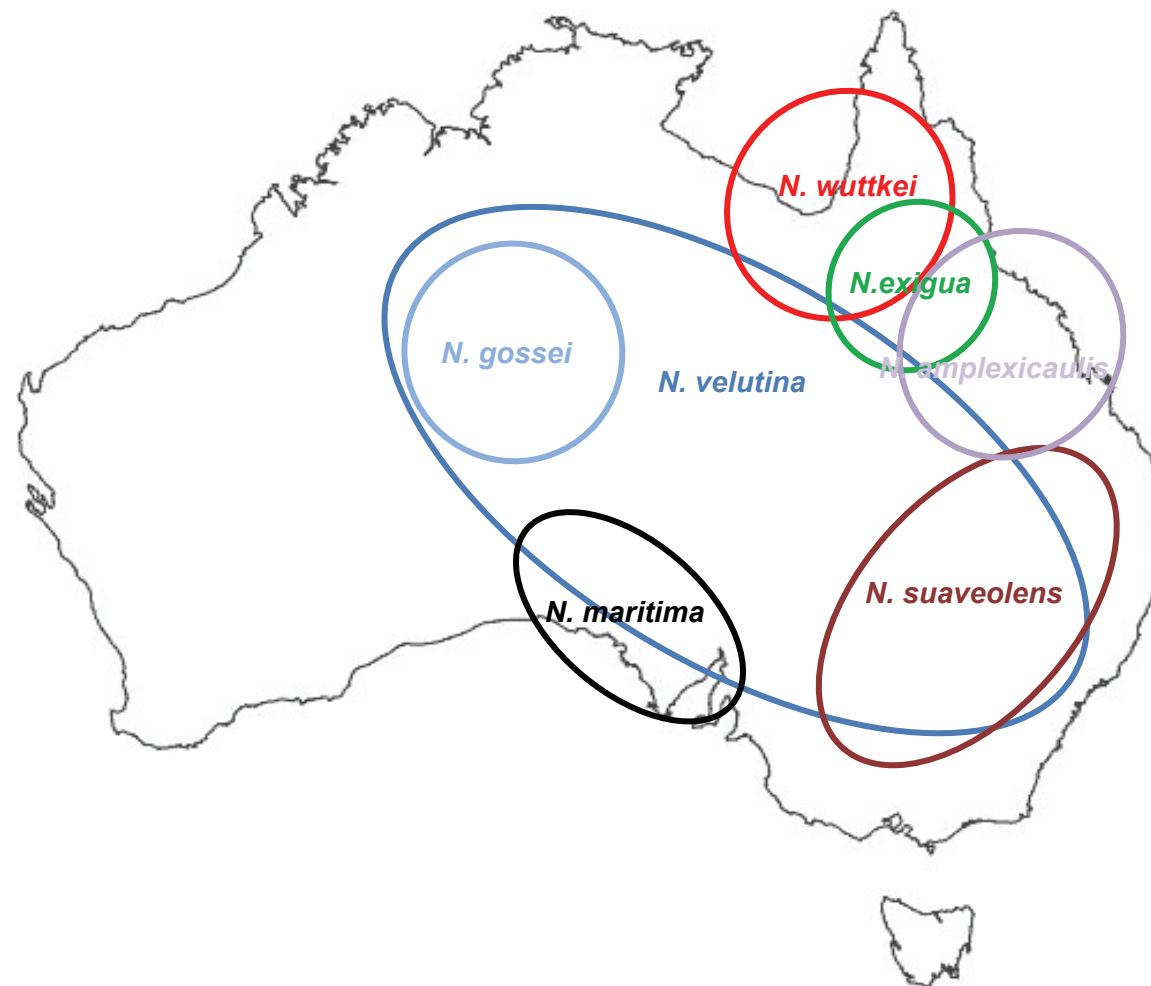


Figura 37. Areali geografici di alcune specie australiane con le quali la *N. wuttkei* presenta o somiglianze morfologiche o stesso numero di cromosomi o similarità genetica rispetto alle altre *Suaveolentes* (Goodspeed,1954; Horton, 1981; Knapp,2004).

Infatti, nella regione del Queensland (Australia) dove è stata scoperta la *N. wuttkei* sono presenti sia la *N. exigua* che la *N. velutina*. Va evidenziato che l'areale della *N. maritima* attualmente limitato alla regione antistante il Golfo di Spencer in tempi meno recenti era più esteso e comune a quello delle due specie sopra citate (Goodspeed, 1954).

L'ipotesi avanzata potrebbe costituire un utile punto di partenza per l'arricchimento delle conoscenze sulla *Nicotiana wuttkei*.

BIBLIOGRAFIA

- Anastasia G. E.**, 1914. *Araldica Nicotianae*. Nuove ricerche alla Filogenesi delle varietà di *N. tabacum* L. R. Ist. Sper. Coltiv. Tab., Scafati.
- Aoki S. and Ito M.**, 2000. Molecular phylogeny of *Nicotiana* (Solanaceae) based on the nucleotide sequence of the *matK* Gene. *Plant Biol.*, 2, 316-324.
- Barcaccia G., Lucchin M., Parrini P.**, 2000. Analisi del genoma mediante marcatori molecolari: I fondamenti metodici. *Riv. Di Sem. El.* 5: 5-15.
- Beckmann J. S., Solter M.**, 1983. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67: 35-43.
- Black J. M.**, 1915-37. Additions to the flora of South Australia. *Trans Roy Soc. South Australia*. Vols. 39-61.
- Bornet B., Goraguer F., Joly G., and Branchard M.**, 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45: 481-484.
- Burbidge N.**, 1960. The Australian species of *Nicotiana* L. (SOLANACEAE). *Australian Journal of Botany*, 8: 342-380.
- Burns J. A.**, 1982. The chromosomes of *Nicotiana africana* Merxm.: a recently discovered species. *The Journal of Heredity* 73(2):115-118.
- Burk L. G. and Durbin R. D.**, 1978. The reaction of *Nicotiana* species to tentoxin. *The Journal of Heredity* 69: 117-120.
- Cersosimo A. and Sorrentino C.**, 1997. Haploidy In *Nicotiana* Spp: In Vitro Haploid Production In Higher Plants. *Current Plant Science and Biotechnology In Agriculture*, Vol. 5 Section 3: 135-164.
- Chase M. W., Knapp S., Cox A. V., Clarkson J. J., Butsko Y. Joseph J., Savolainen V. and Parokonny A. S.**, 2003. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*, 92, 107-127.
- Chen K., Johal S., and Wildman S. G.**, 1976. Role of chloroplast and nuclear DNA genes during evolution of fraction I protein. *In Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria*. T. Bücher, W. Neupert, W.

Sebald and S. Werner, Eds. Elsevier/North Holland Publ. Co., Amsterdam.
p. 3-11.

Clarkson J.R. and Symon D. E., 1991. *Nicotiana wuttkei* (Solanaceae), a new species from north-eastern Queensland with unusual chromosome number. *Austrobaileya*, 3 (3): 389-392.

Clarkson J. J., Knapp S., Garcia V. F., Olmstead R. G., Leitch A.R., Chase M. W., 2004. Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Molecular, Phylogenetics and Evolution*, 33, 75-90.

Domin K., 1929. Beitrage zur Flora und Pflanzengeographie Australiens. *Biblioth. Bot.* 89 : 1144-1148.

East E. M., 1928. The genetics of the genus *Nicotiana*. *Bibliogr. Genet.* 4 : 243-318.

Galván M. Z., Bornet B., Balatti P. A., & Branchard M., 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 132, 297-301.

Gerstel D.U., Burns J. A. and Burk L.G., 1979. Interspecific hybridization with an African tobacco *Nicotiana africana* Merxm. *J. Hered.*, 70: 342-344.

Godwin I. D., Aitken E. A. B. and Smith L. V., 1997. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18, 1524-1528.

Goodspeed, T. H., 1933. Chromosome number and morphology in *Nicotiana* . VI. Chromosome numbers of forty species. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 19: 649-653.

Goodspeed, T. H., 1933a. Notes on *Nicotiana tomentosiformis* (n. sp.) and *Nicotiana wigandioides* K. Koch & Fint. *Ostenia*: 309-314.

Goodspeed, T. H., 1938. Three new species of *Nicotiana* from Peru. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 18: 137-151.

Goodspeed, T. H., 1941a. A fourth new species of *Nicotiana* from Peru. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 18: 195-203.

Goodspeed, T. H., 1944. *Nicotiana arentsii*-a new, naturally occurring amphidiploids species. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 25: 291-306.

- Goodspeed, T. H.**, 1945. Cytotaxonomy of *Nicotiana*. Bot. Rev. 11: 533-592.
- Goodspeed, T. H.**, 1954. The genus *Nicotiana*. Chronica Botanica, Waltham, Mass., U.S.A. 16, n° 1/6, 1-536.
- Greuter W.**, 2000. *The International code of Botanical Nomenclature* (Saint Louis code), Regnum Vegetabile 138, Koeltz, Königstein, Germany.
- Gupta M., Chyi Y-S., Romero-Severson J. & Owen J. L.**, 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theor. Appl. Genet. 89 : 998-1006.
- Gupta P.K. and Varshney R. K.**, 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113: 163-185.
- Horton P.**, 1981. A Taxonomy Revision of *Nicotiana* (SOLANACEAE) in Australia. Journal Adelaide Bot. Gard. 3(1): 1-56.
- Kenton A., Parakonny A.S., Gleba Y.Y., Bennett M.D.**, 1993. Characterization of *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. Mol. Gen. Genet. 240, 159-169.
- Knapp S., Chase M. W., Clarkson J. J.**, 2004. Nomenclature changes and new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae), Taxon, 53,1, 73-82.
- Kostoff D.**, 1940. Relatio degrees and phylaxis of certain *Nicotiana*. species determined bu cytogenetic analysis. Genetica 22: 215-230.
- Kostoff D.**, 1943. Cytogenetics of the genus *Nicotiana*. Karyosystematics, Genetics, Cytology, Cytogenetics and the Phylaxis of Tobaccos. State Printing House, Sofia.
- LaskowsKa D. and Berbeć A.**, 2003. Preliminary study of the newly discovered tobacco species *Nicotiana wuttkei* Clarkson and Symon. Genetic Resources and Crop Evolution, 50, 835-839.
- Lattanzi A.**, 1957. Le Nicoziane-Collana di pubblicazioni scientifiche e tecniche-Istituto Sperimentale per i Tabacchi-Roma. Serie speciale n°2.
- Leitch I.J. and Bennett M.D.**, 1997. Polyploidy in angiosperms. Trends Plant Sci. 2, 470-476.
- Levy A.A. and Feldman M.**, 2002. The impact of polyploid on grass genome evolution. Plant Physiol. 130, 1587-1593.

- McBarron E.J.**, 1976. Medical Veterinary Aspects of Plant Poisons in New South Wales. Dept. of Agriculture N.S.W.
- Macbride F. J.** 1930. Spermatophytes, mostly Peruvian-II. 3. Peruvian Solanaceae. Field Mus. Nat. Hist. Publ. 278. Bot. Ser. 8(2): 105-106.
- Mantel N. A.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
- McGregor C.E., Lambert C.A., Greyling M.M., Louw J.K. & Warnich L.**, 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica, 113, 135-144.
- Merxmüller H., & Buttler K.P.**, 1975. Nicotiana in der Afrikanischen Namib-ein pflanzengeographisches und phylogenetisches Rätsel. Mitt. Bot. Staatssaml. München 12:91-104.
- Millán A.R.**, 1926. Notas críticas sobre las "Nicotianas" de la flora Argentina. Rev. Fac. Agron. Y Vet., Buenos Aires, 5: 172-216.
- Millán A.R.**, 1928. Especies del género Nicotiana de la flora Argentina. Rev. Fac. Agron. Y Vet., Buenos Aires, 6: 169-188.
- Mullis K.B., Faloona F.A.**, 1983. Specific synthesis of DNA in vitro a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymolol. 155: 335-350.
- Nagaoka T. & Ogihara Y.**, 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 94, 597-602.
- Raven P. H., and Axelrod D.I.**, 1974. Angiosperm biogeography and past continental movements. Ann. Missouri Bot. Gard. 61: 539-673
- Reddy M.P., Sarla N., Neeraja C.N. & Siddiq E.A.**, 2000. Assessing genetic variation among Asian A-genome *Oryza* species using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism. Fourth International Rice Genetics Symposium, 22-27 October 2000. IRRI, Philippines, Abstracts p.212.
- Reddy M.P., Sarla N. & Siddiq E.A.**, 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128, 9-17.

- Saiki R. K., Scarf S., Faloona K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arenheim N.**, 1985. Enzymatic amplification of Beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350.
- Schuster R. M.**, 1976. Plate tectonics and its bearings on the geographical origin and dispersal of angiosperms. In *Origin and Early Evolution of Angiosperms*. C.B. Beck, Ed. Columbia U. Press, New York, p. 48-138.
- Setchell W. A.**, 1912. Studies in *Nicotiana*. I Univ. Calif. Publ. Bot. 5: 1-86.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Tate, J.A.**, 2004. Advances in study of polyploidy since plant speciation. *New Phytol.* 161, 173-191.
- Splendore A.**, 1906. *Sinossi Descrittiva ed Iconografia dei Semi del Genere Nicotiana*. Portici. Roma.
- Tautz D.**, 1989. Ipervariability of simple sequences as a source for polymorphic DNA marker. *Nucleic Acid Res.*, 17: 6463-6471.
- Tikunov Yu. M., Khrustaleva L. I., & Karlov G.I.**, 2003. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica*, 131, 71-80.
- Tsumara Y., Ohba K. & Strauss S.H.**, 1996. Diversity and inheritance of inter simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92, 40-45.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijnders M., Van de Lee T., Hornes M., Fritjers A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M.** 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Wendel, J.F.**, 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 42; 225-249.
- Wheeler H-M.**, 1935. Studies in *Nicotiana*. II. A taxonomic survey of the Australasian species. Univ. Calif. Publ. Bot. 18 : 45-68.
- Wheeler H-M.**, 1945. A contribution to the cytology of the Australian- South Pacific species of *Nicotiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 177-185.
- Willaman J.J.**, 1961. Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids. *Tech. Bull. U.S.D.A.* No. 1234.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Raflaski J.A. and Tingey S.V.** 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* vol. 18, n. 22: 6531-6535.

Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.